

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

***Ex-vivo* Untersuchungen an hippocampalen
Hirnschitten der Ratte: Erzeugung räumlich begrenzter
epileptischer Herde**

von Therese Dorothee Van Hove
aus Luxemburg

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Frau Prof. Dr. H. Potschka

Angefertigt im Institut für Physiologie I der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms Universität Münster

Mentor: Prof. Dr. E.-J. Speckmann

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Für meine Familie

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Definitionen, Prävalenz und Bedeutung der Epilepsie	2
2.	Klassifizierung	3
3.	Neuronale Informationsverarbeitung	6
4.	Hippocampus	8
4.1.	Anatomie und neuronale Verschaltung	8
4.2.	Bedeutung des Hippocampus bei Epilepsien.....	10
5.	Experimentelle Epilepsie-Modelle	12
5.1.	Allgemeines	12
5.2.	Wichtige <i>In-vivo</i> Modelle.....	15
5.3.	Wichtige <i>Ex-vivo</i> Modelle	16
6.	Zielsetzung und Wahl des Versuchsmodells	18
III.	MATERIAL UND METHODEN	23
1.	Gewebeschnitte	23
2.	Lösungen und Substanzen	26
2.1.	Badlösungen.....	26
2.2.	Penicillin-Natrium-Lösung	26
3.	Kammer zur Registrierung der bioelektrischen Aktivität in vitalen Hirnschnitten	27
4.	Elektrophysiologische Verfahren zur Auslösung und Registrierung von Feldpotentialänderungen in Neuronenpopulationen	29
5.	Optische Verfahren zur Registrierung von Membranpotentialänderungen in Neuronenpopulationen	31
6.	Versuchsanordnung zur Etablierung begrenzter epileptischer Herde.....	36
7.	Versuchsprotokoll	40
8.	Verfahren zur Auswertung und Darstellung der Messergebnisse.....	44
9.	Histologie	47
IV.	ERGEBNISSE	48
1.	Penicillin-induzierte Wirkung auf die Spontanaktivität der Nervenzellen im Hippocampus	49
1.1.	Versuchsreihe 1: Penicillin-Anwendung in CA3 (n=5)	49
1.2.	Versuchsreihe 2: Penicillin-Anwendung in CA1 (n=4)	53
2.	Penicillin-induzierte Wirkung auf die reizausgelöste Aktivität der Nervenzellen im Hippocampus	56

2.1.	Versuchsreihe 1: Penicillin-Anwendung in CA3 (n=5)	56
2.2.	Versuchsreihe 2: Penicillin-Anwendung in CA1 (n=4)	61
3.	Penicillin-induzierte Wirkung auf die räumlich-zeitliche Synchronisierung der Nervenzellen im Hippocampus.....	66
3.1.	Versuchsreihe 1: Penicillin-Anwendung in CA3 (n=5)	66
3.2.	Versuchsreihe 2: Penicillin-Anwendung in CA1 (n=4)	72
4.	Vergleich der Feldpotentiale und der Fluoreszenzsignale	76
V.	DISKUSSION	78
1.	Zielsetzung	78
2.	Evaluation der Ergebnisse	79
3.	Schlussfolgerung	86
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	88
VII.	SUMMARY	90
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	92
IX.	ANHANG	98
1.	Geräte.....	98
2.	Lösungen und Substanzen	99
3.	Tierversuchsgenehmigung.....	101
4.	Danksagung	103

ABKÜRZUNGEN

A	Amplitude
Abb.	Abbildung
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AgCl	Silberchlorid
AMPA	α -Amino-5-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
Aqua dest.	Aqua destillata
A/2	halbe Höhe der Amplitude
B	Breite
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CA1	Cornu-ammonis-1
CA3	Cornu-ammonis-3
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucose
Cl	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTRL1	Kontrollphase-1
CTRL2	Kontrollphase-2
dl/i	Differenz der Fluoreszenzintensität zur Ausgangsfluoreszenz
FP1	Elektrode zur Ableitung der Feldpotentiale in der CA1-Region
FP2	Elektrode zur Ableitung der Feldpotentiale in der CA3-Region
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
Hz	Hertz

ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie (International Ligue against Epilepsy)
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kHz	Kilohertz
l	Liter
lat.	Latein
mA	Milliampère
Mg	Magnesium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Mol
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Versuchszahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-d-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
PEN	Penicillin-Phase
pH	potentia hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration)
Re	Referenzelektrode
RLI	Resting light intensity
s	Sekunde
ST	Stimulationselektrode
s.	siehe

Tab.	Tabelle
TLE	Temporallappenepilepsie
usw.	und so weiter
U/ml	Volumenaktivität (U=Enzymeinheit; ml=Milliliter)
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
%	Prozent
°C	Grad Celsius
0-Mg	Magnesiumfreie-Phase
0-Mg+PEN	Magnesiumfreie-Penicillin-Phase

I. EINLEITUNG

Die Informationsverarbeitung im Gehirn beruht auf der Fähigkeit der Nervenzellen, über die Veränderung von transmembranösen Ionenströmen bioelektrische Aktivität zu generieren. Kommt es am Kontaktpunkt zwischen den Nervenzellen zu einer Störung der Aktivitätsregulierung, kann es zum Entstehen übermäßiger neuronaler Aktivität und zur Generierung epileptischer Entladungen kommen. Mit dem Vorkommen epileptischer Aktivität wird häufig die übermäßige Synchronisierung der Nervenzellaktivität in Verbindung gebracht (Bernardo et al., 1984). In dieser Studie soll durch die Erzeugung räumlich begrenzter epileptischer Herde sowohl in der CA1- als auch in der CA3-Subregion des Hippocampus ein Einblick in die Prozesse der Reizverarbeitung und der neuronalen Synchronisierung von unterschiedlichen Nervenzellpopulationen bei Krampfaktivität geschaffen werden.

Mit der Ableitung von Feldpotentialen kann dabei das Ausmaß der im Nervenzellverband stattfindenden bioelektrischen Aktivität visualisiert werden. Das optische Registrierverfahren mit Hilfe von spannungssensitiven Farbstoffen ermöglicht gleichzeitig die Beobachtung des Verhaltens einzelner Nervenzellen innerhalb einer Population sowie die Interaktion zwischen den Nervenzellen (Speckmann, 2008). Mit dieser Methode können nicht nur Informationen über die zeitliche Erregungsausbreitung im Nervenzellverband gewonnen werden, sondern auch über die räumliche Synchronisierung der Nervenzellaktivität innerhalb einer Population.

Insgesamt besteht das Ziel der vorliegenden Untersuchungen darin, die Zusammenhänge der Interaktion neuronaler Netzwerke bei der Regulierung der Nervenzellaktivität am gesunden Hippocampus eingehend zu untersuchen. Dazu ist es nötig, lokal begrenzte Veränderungen der neuronalen Erregung hervorzurufen und die Wirkung auf die Populationsaktivität in bestimmten, räumlich definierten Bereichen, zu analysieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Definitionen, Prävalenz und Bedeutung der Epilepsie

Die Epilepsie stellt sowohl für die Humanmedizin als auch für die Veterinärmedizin eine relevante neurologische Erkrankung dar. Weltweit leiden über 50 Millionen Menschen an Epilepsie (WHO, 2012), das entspricht etwa 0,5-1 % der Weltbevölkerung (Aiken et al., 2000). In der Veterinärmedizin zählen Epilepsien mit einer Prävalenz von 0,5-1 % beim Hund (Fischer et al., 2013) und 2,1 % bei der Katze (Schriefl et al., 2008) zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen bei Hund und Katze (Frey et al., 2010). Bei bestimmten Hunderassen mit genetischer Prädisposition zur Epilepsie liegt die Prävalenz deutlich höher (z.B. Belgischer Schäferhund 17%, Border Terrier 13,1 %, Irischer Wolfshund 18,3%; Fischer et al., 2013).

Definitionsgemäß bezeichnet die Epilepsie eine Störung des Gehirns, die mit einem der folgenden Zustände assoziiert ist. Entweder treten zwei (oder mehr) mindestens vierundzwanzig Stunden auseinanderliegende, nicht provozierte epileptische Anfälle auf. Alternativ besteht nach dem Vorkommen eines einzigen nicht provozierten epileptischen Anfalls eine erhöhte Wahrscheinlichkeit (> 60%) zur Entwicklung weiterer epileptischer Anfälle innerhalb der zehn darauffolgenden Jahre (weil der erste Anfall beispielsweise auf einem weit zurück liegenden Schädel-Hirn-Trauma beruht und somit eine erhöhte Disposition für erneute Anfälle besteht). Zuletzt kennzeichnet die sichere Diagnose eines Epilepsiesyndroms das Vorliegen der Epilepsie (Fisher et al., 2014).

Ein epileptischer Anfall ist definiert als vorübergehendes Auftreten von krankhaften Befunden und/oder Symptomen aufgrund einer pathologisch exzessiven oder synchronen neuronalen Aktivität im Gehirn (Fisher et al., 2005).

Das Krankheitsbild der Epilepsie ist für die Patienten mit einer bedeutenden Minderung der Lebensqualität verbunden. Betroffene Menschen und Tiere sowie deren Besitzer werden im alltäglichen Leben mit erheblichen Einschränkungen und psychischen Belastungen konfrontiert. Eine Therapie im Sinne einer Heilung ist heutzutage noch nicht möglich (Löscher and Potschka, 2002). Zur Anfallskontrolle ist in der Regel eine lebenslange Einnahme von antiepileptisch wirkenden Medikamenten notwendig. Diese geht häufig mit unerwünschten Nebenwirkungen einher (Antriebshemmung, herabgesetztes Leistungs- und Konzentrationsvermögen; Demarle-Meusel, 2008). Bei etwa einem Drittel der Patienten kann auch mit der Kombination mehrerer Wirkstoffe keine zufriedenstellende Anfallskontrolle durch eine medikamentöse Therapie erreicht werden (Kwan et al., 2000). In diesen Fällen werden die Epilepsien als pharmakoresistent eingestuft. Je nach Lokalisation des epileptischen Herdes kann bei pharmakoresistenten Epilepsien ein neurochirurgischer Eingriff indiziert sein. Zudem leiden viele Betroffene unter Angststörungen. Bei Patienten mit Epilepsie ist die Mortalität signifikant erhöht, die Lebenserwartung ist reduziert (Trinka, 2006). Einerseits besteht die Gefahr, dass epileptische Anfälle tödlich enden (z.B. durch Unfälle, Ersticken). Andererseits können Grunderkrankungen der symptomatischen Epilepsie (bösartige Hirntumoren, entzündliche Prozesse oder Fehlbildungen des Gehirns) zu einem vorzeitigen Tod der Patienten führen.

2. Klassifizierung

In der für die Humanmedizin entworfenen und international anerkannten Klassifizierung epileptischer Anfälle durch die ILAE (International League Against Epilepsy; (Berg et al., 2010) wird im Hinblick auf die Ausdehnung des epileptischen Fokus grundsätzlich zwischen fokalen und generalisierten Anfällen unterschieden.

Fokale epileptische Anfälle gehen von einem auf eine Großhirnhälfte beschränkten neuronalen Netzwerk aus und können sowohl sehr umschrieben als auch weiter ausgedehnt auftreten. Sie können ihren Ursprung in subcortikalen Strukturen haben (Berg et al., 2010).

Fokale epileptische Anfälle können mit oder ohne Einschränkung des Bewusstseins/der Aufmerksamkeit einhergehen. Da das Vorliegen einer Bewusstseinsstörung nicht immer präzise definiert werden kann, rät die ILAE von den lange gebräuchlichen Termini „einfach“ und „komplex“ zur Beschreibung einer Bewusstseinsstörung ab. Unter Umständen können fokale Anfälle in der Entwicklung eines bilateralen, konvulsiven Anfalls resultieren (bisher als „sekundäre Generalisierung“ bezeichnet; Berg et al., 2010).

Auch wenn für die Beurteilung der klinischen Situation Beschreibungsmerkmale in Abhängigkeit von der Beeinträchtigung während des Anfalls angewendet werden, ist eine strikte Klassifizierung fokaler Anfälle nach dem aktuellen Wissensstand nicht möglich (Berg et al., 2010).

Generalisierte Anfälle gehen von einem bestimmten Punkt eines beide Großhirnhälften beteiligenden neuronalen Netzwerks aus und sind mit sehr rascher Ausbreitung verbunden (Berg et al., 2010). Es können cortikale oder subcortikale Strukturen betroffen sein, so dass ein generalisierter Anfall auch asymmetrisch auftreten kann (Berg et al., 2010). Generalisierte Anfälle gliedern sich weiterhin je nach motorischen Symptomen oder psychischen Beeinträchtigungen in tonisch-klonische, tonische, klonische, myoklonische sowie atonische Anfälle und/oder Absenzen (Berg et al., 2010).

Für den Status epilepticus, der einen lebensbedrohlichen Notfall darstellt, liegt keine einheitliche Definition vor. Er bezeichnet einen Zustand der dauerhaften Übererregung des Gehirns und ist mit dem Vorliegen eines mindestens 5-minütigen Krampfanfalls oder mehreren direkt aufeinander folgenden Anfällen ohne zwischenzeitliche Rückerlangung des Bewusstseins verbunden (Fischer et al., 2013).

Unter Cluster-Anfällen versteht man zwei oder mehr voneinander isolierte Krampfanfälle, die innerhalb von 24 Stunden auftreten (de Lahunta et al., 2009).

Nach ätiologischen Kriterien wird zwischen genetischen (vorher idiopathischen), strukturell-metabolischen (vorher symptomatischen) Epilepsien und Epilepsien unbekannter Ursache (vorher kryptogen) unterschieden (Berg et al., 2010). Genetisch bedingte Epilepsien gehen auf das Vorliegen eines Gendefektes zurück, dessen führendes Syndrom die Epilepsie ist (z.B. kindliche Absenzenepilepsie, autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie, Dravet-Syndrom; Berg et al., 2010). Strukturell-metabolische Epilepsien setzen das Vorhandensein einer separaten Erkrankung voraus, welche sekundär zum Auftreten epileptischer Anfälle führt (z.B. Fehlbildungen, Gliome, mitochondriale Erkrankungen; Berg et al., 2010). Als Epilepsien unbekannter Ursache werden die Formen bezeichnet, bei denen das Vorliegen eines genetischen Defektes nicht eindeutig bewiesen wurde oder bei denen eine neuropathologische Störung/Erkrankung nicht identifiziert wurde (Berg et al., 2010).

In der Tiermedizin gibt es bisher noch keine international anerkannte Klassifikation für epileptische Anfälle (es wird aber zeitnah eine Klassifizierung verfügbar sein). Bisher dient die durch die ILAE entworfene humanmedizinische Klassifikation von 1989 der Orientierung (ILAE, 1989). Demnach sind hier die Begriffe „idiopathisch“, „symptomatisch“ und „kryptogen“ momentan noch gebräuchlich. Die idiopathische Epilepsie ist charakterisiert durch wiederholtes, unregelmäßiges Auftreten von fokalen und/oder generalisierten Anfällen ohne nachweisbare Ursache aufgrund einer genetischen Prädisposition (Fischer et al., 2013). Symptomatische Epilepsien werden durch intrakranielle oder extrakranielle Erkrankungen (z.B. Entzündungen, Neoplasien, Infarkte, Schädel-Hirn-Trauma) hervorgerufen (Fischer et al., 2013). Bei der kryptogenen Epilepsie kann keine Grundkrankheit nachgewiesen werden und eine genetische Ursache erscheint z.B. aufgrund eines hohen Alters beim ersten Anfall unwahrscheinlich (Fischer et al., 2013). Eine genaue Klassifizierung der Epilepsien ist beim Haustier mit Einschränkungen verbunden. Hinsichtlich der

Einteilung nach Anfallstypen besteht die Schwierigkeit einer eindeutigen Differenzierung fokaler und generalisierter Anfälle, ebenso wie der Identifizierung vorliegender Bewusstseinsstörungen (Fischer et al., 2013). Es liegt fast nie ein interiktales oder iktales EEG vor, so dass grundsätzlich keine exakte Anfallszuordnung gelingt (Fischer et al., 2013).

3. Neuronale Informationsverarbeitung

Elementare Voraussetzung für die Erregungsverarbeitung im Gehirn ist die Interaktion zwischen den einzelnen Nervenzellen. Die Signalübertragung im Hippocampus erfolgt wie im gesamten ZNS über Nervenzellverbindungen, die als Synapsen bezeichnet werden. Das Grundprinzip der Erregungsweiterleitung beruht auf der Umwandlung eines elektrischen Signals in ein chemisches Signal am Kontaktpunkt zwischen zwei Neuronen. Die synaptische Neurotransmission basiert auf der Bildung von Neurotransmittern im präsynaptischen Neuron, deren Freisetzung in den synaptischen Spalt und deren Bindung an spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Nach ihrer Wirkung an der Zielstruktur wird zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmittern unterschieden.

GABA (γ -Aminobuttersäure) ist der wesentliche inhibitorische Transmitter im zentralen Nervensystem (von Engelhardt und Breves, 2000). Glutamat und Aspartat stellen hingegen die wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter dar.

GABA, als wichtigster hemmender Neurotransmitter, wird aus Glutamat, einem der wichtigsten erregenden Neurotransmitter, synthetisiert.

Die GABA-Rezeptoren werden in zwei Hauptgruppen unterteilt. Zum einen existieren ionotrope Rezeptoren, die Liganden-gesteuerte Ionenkanäle darstellen (GABA_A und GABA_C). Sowohl GABA_A - als auch GABA_C -Rezeptoren bilden Chloridkanäle (Johnston, 2005), die ein schnelles inhibitorisches

postsynaptisches Potential initiieren (von Engelhardt und Breves, 2000) und so der Weiterleitung eines Aktionspotentials entgegenwirken.

Zum anderen gibt es metabotrope, G-Protein-gekoppelte GABA-Rezeptoren (GABA_B ; Johnston, 2005). Der GABA_B -Rezeptor kann sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein (von Engelhardt und Breves, 2000). Die Bindung von GABA am GABA_B -Rezeptor führt zu einer Aktivierung von G-Proteinen. Daraufhin kommt es durch eine postsynaptisch verstärkte Kaliumleitfähigkeit und eine präsynaptisch verminderte Kalziumleitfähigkeit zu einer neuronalen Inhibition (Kuriyama et al., 2000).

Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat vermittelt seine postsynaptische Wirkung über die Bindung an verschiedene ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Während die metabotropen Glutamat-Rezeptoren eine G-Protein-gekoppelte neuronale Exzitation vermitteln, funktionieren die ionotropen Glutamat-Rezeptoren als ligandengesteuerte Ionenkanäle. Die Glutamat-Rezeptoren sind nach ihrem jeweiligen Agonisten benannt und werden in AMPA- (α -Amino-5-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure), NMDA- (N-Methyl-d-Aspartat) und Kainat-Rezeptoren unterteilt (Purves et al., 2001). AMPA- und Kainat-Rezeptoren werden auch *non-NMDA*-Rezeptoren genannt. Sie sind permeabel für Na^+ - und K^+ -Ionen. Durch einen Na^+ -Einstrom und einen K^+ -Ausstrom kommt es zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran und zur Auslösung schneller, erregender postsynaptischer Potentiale (EPSPs; Frey et al., 2010).

Der NMDA-Rezeptor wird physiologischerweise durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert. Diese spannungsabhängige Magnesium-Blockade kann durch die Aktivierung lokaler *non-NMDA*-Rezeptoren (z.B. AMPA) aufgehoben werden (Frank, 2005). Nach einer anfänglichen Depolarisation und damit nach der Aufhebung der Magnesium-Blockade wird der Ionenkanal für Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen durchlässig. Die Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen führt zu einer Aktivierung verschiedener *second messenger* Systeme (Frank, 2005), wodurch langsame, länger anhaltende exzitatorische Prozesse vermittelt werden (von Engelhardt und Breves, 2000).

Eine Störung der synaptischen Inhibition und Exzitation kann in der Entstehung exzessiver synchroner Nervenzellaktivität resultieren und somit das Auftreten epileptischer Anfälle begünstigen.

4. Hippocampus

4.1. Anatomie und neuronale Verschaltung

Die paarig angelegte „Hippocampusformation“ besteht aus Gyrus dentatus, Cornu ammonis (Hippocampus proprius) und Subiculum (Schünke et al., 2006). Als Teil des Archicortex gehört der Hippocampus zum phylogenetisch ältesten Teil des Cortex. Makroskopisch sichtbar ist der als Allocortex bezeichnete dreischichtige Aufbau aus zellkörperhaltigen und faserführenden Bereichen. Das dichte Prinzipalzellband enthält im Gyrus dentatus die Körnerzellen und im Cornu ammonis die Pyramidenzellen. Die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus grenzt nach außen an eine weitgehend azelluläre Molekularschicht, in der die Dendriten der Körnerzellen verlaufen. Nach innen umschließt die Körnerzellschicht hufeisenförmig den Hilus, der in geringer Dichte inhibitorische GABAerge Interneurone und exzitatorische Mooszellen enthält (Langer, 2011). Entsprechend der Größe und Dichte der Pyramidenzellen in der Prinzipalzellschicht wird das Ammonshorn in die Regionen CA1 bis CA3 (Cornu Ammonis) unterteilt. Die CA1-Region enthält kleine, locker gepackte Pyramidenzellen. In der CA2-Region liegen dicht gepackte, große Pyramidenzellen. Die CA3-Region enthält locker liegende, große Pyramidenzellen (Braunschweig, 2008).

Die wichtigste afferente Bahn der Hippocampusformation bildet der Tractus perforans. Ausgehend von den oberflächlichen Schichten des enthorhinalen Cortex ziehen die Axone dieses Faserbündels durch die Regio enthorinalis, das

„Tor zum Hippocampus“ in den Gyrus dentatus. Hier teilt sich ein Großteil der Fasern, so dass je eine Axonkollaterale zur oberen und eine zur unteren Molekularschicht zieht (Langer, 2011). Dort kommt es zur Ausbildung synaptischer Kontakte mit den Dendriten der Körnerzellen. Die Axone der Körnerzellen interagieren mit inhibitorischen Interneuronen und glutamergen Mooszellen im Gyrus dentatus und laufen als Moosfasern zu den Dendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region.

Die Axone der CA3-Pyramidenzellen ziehen als Schaffer'sche Kollateralen weiter zu den Dendriten der CA1-Pyramidenzellen. Von hier aus werden die Informationen über die Axone der CA1-Pyramidenzellen direkt oder mit Verschaltung im Subiculum zurück zum enthorhinalen Cortex geleitet. Neben dieser sogenannten „trisynaptischen Verschaltung“ bestehen direkte intrahippocampale Verbindungen. Hierbei werden die Afferenzen aus dem enthorhinalen Cortex direkt, unter Umgehung des Gyrus Dentatus, zu den Dendriten der CA1-Pyramidenzellen gesandt. Die Axone der CA1-Pyramidenzellen projizieren die Signale wiederum zum Subiculum und enthorhinalen Cortex.

Die Inhibition der Prinzipalzellen (Pyramidenzellen und Körnerzellen) wird hauptsächlich durch GABAerge Interneurone kontrolliert. Es handelt sich um eine sehr heterogene Zellgruppe mit kurzen Axonen, die eine lokale Inhibition provoziert. Unterschieden wird zwischen zwei Mechanismen der Inhibition. Bei der (afferenten) Vorwärtshemmung erregt ein exzitatorisches Neuron gleichzeitig eine Prinzipalzelle und ein Interneuron. Das Interneuron inhibiert wiederum die Prinzipalzelle, so dass dem exzitatorischen Potential in der Prinzipalzelle ein inhibitorisches Potential folgt. Bei der (rekurrenten) Rückwärtshemmung wird das Interneuron durch die Prinzipalzelle selbst erregt, woraufhin das Interneuron die Prinzipalzelle inhibiert (Matzen, 2004).

Die Einteilung der Interneurone erfolgt nach morphologischen, neurochemischen und physiologischen Kriterien sowie nach Eigenschaften der Netzwerk-Verbindungen (Maccaferi and Lacaille, 2003). Sie sind maßgeblich an der Synchronisierung der Pyramidenzellaktivität beteiligt (Klausberger, 2009).

Die Interneurone üben weiterhin eine Inhibition auf andere, umliegende Interneurone aus (Chamberland et al., 2012).

Der Verlust GABAerger Interneurone oder Dysfunktionen der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Inhibition stellen wichtige Ursachen bei der Entstehung epileptischer Anfälle dar (Lang et al., 2014).

4.2. Bedeutung des Hippocampus bei Epilepsien

Am häufigsten tritt beim Menschen mit etwa 60-70% aller fokalen Epilepsien und etwa 40% aller Epilepsien überhaupt das Syndrom der Epilepsie des medialen Temporallappens auf (Schmidt und Elger, 2002). Klinisch äußert sich diese Epilepsieform durch das Auftreten komplex-fokaler Anfälle mit eventueller sekundärer Generalisierung. Der Entstehungsort des epileptischen Fokus liegt bei der Temporallappenepilepsie (TLE) in den Strukturen des Schläfenlappens und im Besonderen im Hippocampus. Als Teil des limbischen Systems übernimmt der Hippocampus eine essenzielle Rolle in der Informationsverarbeitung des deklarativen Gedächtnisses (Jokeit, 2010). Gleichzeitig stellt die TLE eine Epilepsieform dar, bei der in vielen Fällen mit einer medikamentösen Behandlung kein Therapieerfolg erzielt werden kann, so dass eine chirurgische Entfernung des erkrankten Hirngewebes oftmals die letzte Therapiemaßnahme zur Anfallskontrolle darstellt.

Das aus dem Temporallappen pharmakoresistenter Epilepsie-Patienten gewonnene Resektionsgewebe weist in vielen, aber nicht in allen Fällen charakteristische makroskopische und histologische Veränderungen auf. Diese Veränderungen werden unter dem Begriff der Hippocampusklerose, auch Ammonshornsklerose genannt, zusammengefasst. Makroskopisch liegt eine Verhärtung und Schrumpfung des Hippocampus vor. Mikroskopisch zeichnet sie sich durch einen Untergang von Neuronen mit reaktiver, durch exzessive Glutamat Ausschüttung bedingter Gliose im Bereich des Ammonshorns aus

(Braunschweig, 2008). Eine durch die ILAE entworfene Klassifizierung beschreibt drei Formen der Hippocampussklerose (Blümcke et al., 2013). Beim Typ 1 sind ein ausgeprägter Neuronenverlust und eine Gliose überwiegend in den Regionen CA1 und CA4 sichtbar. Während sich diese Veränderungen beim Typ 2 vor allem in CA1 auftreten, sind sie im Typ 3 auf den Bereich CA4 beschränkt. Anders als beim Menschen wurden beim Hund sekundäre Veränderungen im Hippocampus im Zusammenhang mit Epilepsie nur selten nachgewiesen (Fischer et al., 2013). Bei Katzen mit Epilepsie wurden zum Teil Hippocampusveränderungen in Form der felines Hippocampusnekrose (FHN) beschrieben. Bei 11 von 17 Katzen, die unter akuten komplex-partialen epileptischen Anfällen mit orofazialen Symptomen (Speicheln, Schmatzen usw.) litten, wurde das Auftreten histopathologischer Veränderungen des Hippocampus beobachtet (Pakozdy et al., 2011). Ebenso lagen in 38 an akuten komplex-partialen oder generalisierten Anfällen leidenden Katzen bilaterale, akute, neurodegenerative Veränderungen des Hippocampus (teils mit Beteiligung des Lobus piriformis) vor (Fatzner et al., 2000). Die Autoren gehen in diesem Fall allerdings von einer durch einen unbekannten Faktor bedingten Schädigung des Gewebes aus (möglicherweise Vergiftungen). Wagner und Kollegen sahen histologische Veränderungen in Form der Hippocampussklerose (Neuronenverlust und Astroglie), wie sie beim Menschen mit TLE beschrieben sind, bei etwa einem Drittel der untersuchten epileptischen Katzen (Wagner et al., 2014). Meist waren diese Befunde mit dem Vorliegen infiltrativer Prozesse, wie etwa limbischer Enzephalitiden, verbunden (Wagner et al., 2014).

Für die vergleichsweise häufige Entstehung epileptischer Herde im Hippocampus sind mehrere Ursachen bekannt. Die Hippocampus-Neurone und im Besonderen die Pyramidenzellen der CA3-Region weisen, im Gegensatz zu kortikalen Neuronen, eine vergleichsweise niedrige „Krampfschwelle“ auf (Tosaki, Yuasa and Kageyama, 1982). Die Bereitschaft zur Erzeugung spontaner Aktivität im Zellverband begründen Miles und Wong (1983) mit dem Vorhandensein exzitatorischer Synapsen zwischen den Pyramidenzellen der

CA3-Region. Dadurch können Entladungen eines einzelnen Neurons das Entstehen synchroner Aktivität im Zellverband fördern (Miles and Wong, 1983). Diese exzitatorischen Zellverbindungen fehlen den Pyramidenzellen der CA1-Region, so dass das Entstehen intrinsischer Aktivität hier seltener ist (Menendez de la Prida and Pozo, 2002).

Die Hyperexzitabilität des Hippocampus wird weiterhin begründet durch einen sehr kleinen Extrazellularraum, welcher die Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität fördert (Jefferys, 1995). Verschiebungen der Ionenkonzentrationen im Extrazellularraum durch die Depolarisation benachbarter Neurone fallen deshalb stärker ins Gewicht als in anderen Hirnregionen (Matzen, 2004).

Im Hinblick auf die Erforschung der Temporallappenepilepsie (TLE) wird dem Hippocampus bei experimentellen Untersuchungen eine bedeutungsvolle Rolle zugewiesen.

5. Experimentelle Epilepsie-Modelle

5.1. Allgemeines

Die Notwendigkeit sowie die klinische Relevanz der Epilepsieforschung ergeben sich direkt durch die hohe Anzahl betroffener Patienten. Grundvoraussetzung für die Entwicklung zielgerichteter Therapien ist eine fortwährende Erweiterung der Kenntnisse über die komplexen pathophysiologischen Prozesse, die zur Entstehung von Epilepsien beitragen. Tierexperimentelle Untersuchungen sind im Bereich der spezieübergreifenden Epilepsieforschung insofern unabdingbar, als dass der Zugang zu vitalem menschlichem und tierischem Hirngewebe nur sehr beschränkt möglich ist. In der Humanmedizin gelingt der Zugang zu epileptischem Hirngewebe nur nach

der neurochirurgischen Entfernung epileptisch aktiver Herde als letzte therapeutische Maßnahme in Fällen pharmakoresistenter Epilepsien. Häufig handelt es sich hierbei allerdings um chronisch verändertes Gewebe. Zudem ist eine Vergleichbarkeit zwischen dem so gewonnenen Hirngewebe aufgrund verschiedener Faktoren, wie zum Beispiel Unterschieden im Patientenalter sowie in der medikamentösen Vorbehandlung, meist nicht möglich. Das Tiermodell bietet den Vorteil der besseren Kontrollierbarkeit dieser Variablen (Pitsch, 2008).

In der Tiermedizin spielen neurochirurgisch Eingriffe bei Epilepsien aktuell eine untergeordnete Rolle, so dass der Zugang zu epileptisch aktivem Gewebe aus Patienten nicht gegeben ist. Erstens fehlen die diagnostischen Möglichkeiten, den Fokus exakt zu lokalisieren, zweitens muss die Operation unter Lokalanästhesie am wachen und „sprechfähigen“ Patienten durchgeführt werden, um lebenswichtige Zentren im Gehirn nicht zu verletzen, so dass die Epilepsiechirurgie in der Veterinärmedizin auf experimentelle Studien beschränkt bleibt (Rentmeister, 2003).

Ausschlaggebend für das Verständnis pathophysiologischer Prozesse sind außerdem immer auch Untersuchungen an nicht affektiertem Gewebe. Die Entschlüsselung elementarer Prozesse, die zur Entstehung und Ausbreitung der Hyperexzitation im neuronalen Netzwerk beitragen, ist entscheidend für ein spezieübergreifendes Verständnis epileptischer Aktivität. Im Falle der Epilepsieforschung steht aus ethischen Gründen weder beim Menschen noch beim Haustier gesundes Hirngewebe von Patienten zur Verfügung. Folglich muss für Untersuchungen an gesundem Gewebe auf Material von Versuchstieren zurückgegriffen werden. Tierexperimentelle Untersuchungen stellen derzeit sowohl in der humanmedizinischen als auch in der veterinärmedizinischen Epilepsieforschung eine unersetzbare Maßnahme zur Aufbesserung des aktuellen Wissenstandes dar. Für die Humanmedizin muss die Übertragbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse mit möglichst geringem Fehler auf die Gegebenheiten beim Menschen abgeschätzt werden (Speckmann, 1986).

Die pathophysiologischen Prozesse in epileptisch aktivem Gewebe können *In-vivo* (lat. „im Lebendigen“) und *Ex-vivo* (lat. „außerhalb des lebendigen Organismus“) studiert werden. Aus einer Vielzahl von etablierten Epilepsiemodellen kann für die angesetzte Untersuchung die am besten geeignete Methode gewählt werden.

Grundsätzlich wird zwischen chronischen und akuten Epilepsiemodellen unterschieden. Chronische Epilepsie-Modelle beinhalten eine irreversible Veränderung des Hirngewebes und erlauben die Erforschung von Prozessen der Epileptogenese. Diese beschreibt die Entstehungsmechanismen bei Epilepsien (Lerche et al., 2011). Chronische Modelle der Epilepsieforschung finden weiterhin Verwendung bei der Erprobung antiepileptisch wirksamer Medikamente (Buckmaster, 2004). Dabei liefern sie im Vergleich zu akuten Modellen genauere Informationen über klinische Wirksamkeit und Nebenwirkungen der zu testenden Substanzen (Löscher, 2002). Akute Epilepsiemodelle finden an primär gesunden Tieren oder gesundem Hirngewebe statt. Die Auslösung epileptischer Aktivität erfolgt durch elektrische Reizung oder durch die Anwendung von Wirkstoffen (Speckmann, 1986). Sie eignen sich besonders für die Erforschung grundlegender Mechanismen der Anfallsentstehung (Iktogenese) und Anfallsbeendigung (Pitkänen et al., 2005), sowie zur Prüfung der Wirksamkeit antikonvulsiver Substanzen (Bizière et al., 1987).

5.2. Wichtige *In-vivo* Modelle

Im Zusammenhang mit der TLE wird in der Krankengeschichte vieler Patienten das Vorliegen eines initialen Hirninsults beschrieben. Als primäres Ereignis werden Schädel-Hirn-Traumen, frühkindliche Fieberkrämpfe, das Vorliegen eines Status Epilepticus sowie infektiös oder toxisch bedingte Hirnschäden diskutiert (Buckmaster, 2004). Diesem primären Ereignis folgt zunächst eine mehrjährige anfallsfreie Zeit (Latenzzeit) bis es zum Auftreten spontaner epileptischer Anfälle kommt (El-Hassar et al., 2007). In dieser chronischen Phase ist histologisch ein Aussprossen exzitatorischer Neurone und ein Verlust inhibitorischer GABAerger Interneurone sichtbar (El-Hassar et al., 2007).

Der klinische Verlauf der TLE wird in chronischen *In-vivo* Untersuchungsmodellen nachgestellt. Auf unterschiedliche Weise wird eine irreversible Schädigung des Hirngewebes evoziert, um chronische Veränderungen und eine funktionelle Reorganisation des Gewebes, wie sie bei der Hippocampussklerose auftreten, zu untersuchen. Eines der wichtigsten chronischen Untersuchungsmodelle der TLE ist das „Kindling-Modell“. Durch wiederholte unterschwellige elektrische Reizungen werden irreversible Veränderungen des Schläfenlappens hervorgerufen, so dass die Reizschwelle in diesem Bereich herabgesetzt wird (Fritschy, 2004). Der Kindlingprozess resultiert in einem Zustand permanenter Übererregbarkeit und spiegelt die Latenzzeit zwischen einem initial hirnschädigenden Ereignis und dem Beginn des Auftretens spontaner Anfälle wieder (Nolte, 2005). Chronische Läsionen des Hippocampusgewebes können ebenso durch die systemische oder intrazerebrale Injektion von pharmakologisch wirksamen Substanzen provoziert werden. Häufig werden Pilocarpin oder Kainat zur Erzeugung von Gewebeschäden verwendet. Bei Pilocarpin handelt es sich um einen muskarinergen Acetylcholinrezeptoragonisten, der bei Injektion zu Läsionen des Hippocampus und gegebenenfalls des Neocortex führt (Kandratavicius et al., 2014). Kainat ist ein L-Glutamat-Analogon, welches die Entstehung einer Hippocampussklerose bedingt (Kandratavicius et al., 2014).

Ebenso kann eine irreversible Reorganisation des Hippocampus-Gewebes, wie sie nach frühkindlichen Fieberkrämpfen, nach hypoxischen oder ischämischen Zuständen sowie nach toxisch bedingten Schädigungen auftritt, experimentell nachgestellt werden. Fieberkrämpfe werden im Versuchsmodell erzeugt, indem etwa 10 Tage alten Ratten für 30 Minuten in eine auf 41°C erhitzte Versuchskammer überführt werden (Buckmaster, 2004). Hypoxische Schäden werden im Versuch bei Ratten durch einen 20-minütigen Aufenthalt in einem sauerstoffarmen Milieu (3-4% O₂) hervorgerufen (Buckmaster, 2004). Ischämische Schäden des Hirngewebes können experimentell durch die Ligatur der rechten Arteria carotis communis an narkotisierten Ratten ausgelöst werden (Buckmaster, 2004). Toxisch bedingte Gewebeschäden können durch die intrahippocampale Injektion von Tetanus-Toxin provoziert werden (Buckmaster, 2004).

Bei akuten Epilepsiemodellen, auch Anfallsmodelle genannt, wird die Auslösung epileptischer Anfälle an gesundem Gewebe durch elektrische, chemische oder thermische Stimulation induziert (Speckmann, 1986). Die wichtigsten Modelle zur akuten Auslösung epileptischer Anfälle am lebenden Tier stellen der „Maximale-Elektroschock-Test“ und der „Pentylentetrazoltest“ dar. Beim „Maximalen-Elektroschock-Test“ wird durch elektrische Stimulation der Cornea ein generalisierter tonisch-klonischer Anfall ausgelöst (Nolte, 2005). Mit der Verabreichung von Pentylentetrazol kommt es zum Auftreten akuter Myoklonien und tonisch-klonischer Anfälle.

5.3. Wichtige *Ex-vivo* Modelle

Alternativ zu experimentellen Methoden am lebenden Tier existieren mehrere *Ex-vivo* Epilepsie-Modelle, bei denen die Prozesse der Entstehung epileptischer Aktivität außerhalb des Körpers untersucht werden können.

An isolierten Neuronen (*single neurons*) kann beispielsweise die Beteiligung der Ionenkanäle bei der Entstehung von Aktionspotentialen untersucht werden (Pitkänen et al., 2005).

Die akute Generierung, Propagation und Beendigung epileptiformer Aktivität im Neuronennetzwerk kann grundsätzlich in Zellkulturen, in akuten Hirnschnitten (*acute slices*) oder in organotypischen Hirnschnitten (*organotypic slices*) untersucht werden.

Die Herstellung von hippocampalen Zellkulturen erfolgt durch laparotomische Entnahme von Ratten- oder Mäuseföten aus dem Muttertier. Die Hippocampi werden isoliert und mechanisch oder enzymatisch dissoziiert. Anschließend werden die gesunden Zellen kultiviert, so dass es zur Ausbildung neuronaler Netzwerke kommt. Zellkulturen eignen sich zur Untersuchung von Ionenströmen und synaptischer Plastizität. Ein Nachteil dieser Untersuchungsmethode ist allerdings eine hohe Variabilität der Zelllinien (je nach Firma), die sich auf die Untersuchungsergebnisse auswirken kann (Pitkänen et al., 2005).

Die Präparation vitaler Hirnschnitte aus juvenilen oder adulten Tieren erlaubt eine hochwertige Untersuchung von Mechanismen der Entstehung und Ausbreitung von epileptischer Aktivität im Neuronennetzwerk. Zum einen ermöglicht die Anfertigung von Hirnschnitten den Zugang zu Arealen, die *In-vivo* schlecht erreichbar sind. Zum anderen bleibt die funktionelle Organisation des Hirngewebes größtenteils erhalten (Pitkänen et al., 2005). Im Hirnschnitt können elektrische und pharmakologische Reizung des Gewebes relativ einfach und gezielt durchgeführt werden (Pitkänen et al., 2005). Als vorteilhaft erweist sich die teilweise Aufrechterhaltung interstruktureller Verbindungen (z.B. zwischen Cortex und Hippocampus). Ein Nachteil dieser Methode ist eine präparationsbedingte unvermeidbare ischämische Phase und die Beschädigung zahlreicher Faserverläufe bei der Gewebeentnahme (Pitkänen et al., 2005). Die *Ex-vivo* durch Diffusion sichergestellte Versorgung des Gewebes mit Substraten und Sauerstoff hat nicht die gleiche Effizienz wie eine vaskuläre Versorgung *In-vivo* (Pitkänen et al., 2005). Eine ständige Kontrolle des pH-

Wertes und der Temperatur der künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit ist im Versuch essenziell, um eine optimale Versorgung des Gewebes zu gewährleisten. Bisher gibt es wenig Informationen über Untersuchungen an chronisch veränderten Hirschnitten (Pitkänen et al., 2005), so dass diese Methode vor allem Auskunft über Mechanismen der Iktogenese in primär gesundem Hirngewebe liefert. Ein großer Vorteil dieser akuten Anfallsmodelle ist das Beobachten des Überganges von physiologischer neuronaler Aktivität zur Krampfaktivität (Speckmann, 1986).

Organotypische Hirschnitten können durch Kultivierung akuter Hirschnitte hergestellt werden. Während dieser Phase der Kultivierung können sich präparationsbedingt beschädigte Nervenfasern regenerieren. Durch die Neubildung der synaptischen Strukturen und die intakteren Projektionswege liegen die Gegebenheiten im organotypischen Hirschnitt im Vergleich zu akuten Hirschnitten näher an der *In-vivo* Situation (Pitkänen et al., 2005). Allerdings besteht die Gefahr der Ausbildung abnormaler Verbindungen zwischen den Zellen (fehlt beispielsweise der enthorhinale Cortex bei Hippocampus-Schnitten, kommt es teils zur unvollständigen Entwicklung des Gyrus dentatus; Pitkänen et al., 2005). Der wohl größte Vorteil dieser Methode liegt in der Untersuchung langfristiger Prozesse, da die Schnitte nach dem Experiment im Inkubator für eine weitere Zeit vital gehalten werden können (Pitkänen et al., 2005).

6. Zielsetzung und Wahl des Versuchsmodells

Die Wahl des geeigneten Versuchsmodells für ein bestimmtes Untersuchungsvorhaben richtet sich nach der jeweiligen Fragestellung (Fritschy, 2004), da kein Epilepsie-Modell alle Fragen gleichzeitig beantworten kann.

In diesem Fall war das Ziel der vorliegenden Versuche die Erzeugung akuter und lokal begrenzter epileptischer Herde in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus. Gegenstand der Untersuchung war die Analyse des Verhaltens einzelner Nervenzellgruppen innerhalb der CA1- und CA3-Region vor, während und nach der Auslösung fokal begrenzter epileptischer Aktivität in primär gesundem Hirngewebe. Im Hinblick auf die Entschlüsselung der Mechanismen der Iktogenese in chronisch verändertem Hirngewebe bei der TLE scheint eine Charakterisierung der epileptischen Aktivität gesunder Nervenzellen unverzichtbar.

Die Präparation akuter Hippocampus-Schnitte erlaubte die gezielte Anwendung von Maßnahmen (elektrische Stimulation und Applikation von Penicillin) zur Auslösung begrenzter epileptischer Aktivität. Zudem ist in akuten Hirnschnitten die gleichzeitige Registrierung von Feldpotentialänderungen (Ableitung von Feldpotentialen) und Membranpotentialänderungen (mit Hilfe spannungssensitiver Farbstoffe) möglich.

Die konventionelle Ableitung extrazellulärer Feldpotentiale erlaubt eine Übersicht der im Nervenzellverband stattfindenden bioelektrischen Aktivität. Feldpotentiale präsentieren sich als Potentialdifferenzen im extrazellulären Raum (Speckmann und Walden, 1991) und sind bedingt durch die Veränderung transmembranöser Ionenströme (Speckmann, 2008).

Die Bildgebung der Membranpotentiale mit Hilfe spannungssensitiver Farbstoffe ermöglicht die direkte, also weder durch Vermittlung von Feldeffekten noch durch Stoffwechseländerungen beeinflusste Beobachtung von Nervenzellen (Speckmann, 2008). Das Verhalten einzelner Nervenzellen innerhalb einer Population sowie der Interaktion zwischen den Nervenzellen kann mit dem optischen Registrierverfahren visualisiert werden (Speckmann, 2008). Diese Methode wurde erstmals 1968 beschrieben (Cohen et al., 1968). Sie macht die bildliche Wiedergabe der Synchronisationsvorgänge der Nervenzellaktivität im Nervenzellverband möglich. Die exakte Kontrolle über das extrazelluläre Milieu, der direkte Zugang zu definierten Zellpopulationen, das Applizieren von genau dosierten pharmakologisch wirksamen Substanzen

(Broicher et al., 2012) und die hervorragende zeitliche Auflösung (Speckmann, 2008) machen diesen Versuchsaufbau für die Neurophysiologie sehr wertvoll. Aufgrund gravierender Restriktionen ist diese Methode allerdings nur im *Ex-vivo* Modell anwendbar. Die Erfassung der Nervenzellaktivität ist aufgrund der Entstehung toxischer Radikale zeitlich begrenzt (Speckmann, 2008).

Es stehen zwei Perfusionskammer-Typen zur Registrierung der bioelektrischen Aktivität von Nervenzellen im Hirnschnitt zur Verfügung. In den vorliegenden Versuchen wurden die Gewebeschnitte in eine Versuchskammer vom „submerged type“ untersucht. Der Hirnschnitt wird in diesem Kammer-Typ ständig von Badlösung umspült, so dass eine optimale Versorgung des Schnittes durch eine ständige Erneuerung der Badlösung gewährleistet wird. Die durchgehende Kontrolle von pH-Wert und Temperatur innerhalb der Versuchskammer ist essenziell zur bestmöglichen Nachahmung der *In-vivo* Verhältnisse. Im Gegensatz dazu wird der Hirnschnitt in der „interface“ Kammer auf einem Netzträger platziert und wird von oben mit einer mit Sauerstoff angereicherten Nährlösung bedampft (Mulisch und Velsch, 2010).

Die Erzeugung epileptischer Aktivität im gesunden Hirngewebe kann durch die Beeinflussung der synaptischen Übertragung erfolgen. Physiologischerweise wird die Grundaktivität im Gehirn durch die synaptische Inhibition und Exzitation reguliert (Wong and Prince, 1979; Schwartzkroin and Prince, 1980). Die γ -Aminobuttersäure (GABA) stellt den wichtigsten inhibitorischen und Glutamat den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem dar. Eine Vermehrung der Exzitation oder eine Verminderung der Inhibition können durch verschiedene konvulsive Maßnahmen erreicht werden. Für die Erzeugung lokal begrenzter Aktivität, also zur Imitierung von akuten Partialanfällen im Tiermodell, eignen sich die begrenzte elektrische Stimulation sowie die lokale Anwendung von Wirkstoffen, welche ein rasches, reversibles Auslösen epileptischer Entladungen ohne ausgeprägte histologische Veränderungen hervorrufen (Speckmann, 1986).

Die Reduktion der extrazellulären Kalzium-Konzentration, die Erhöhung extrazellulärer Kaliumkonzentrationen sowie magnesiumfreie Badlösungen führen zu einer Steigerung der Netzwerkaktivität im gesunden Hirngewebe (Losi et al., 2015). Weiterhin kann die Zugabe von Pentylenetetrazol, NMDA, Tetanustoxin sowie von GABA-Rezeptorantagonisten wie Penicillin, Picrotoxin und Bicuculline epileptische Aktivität hervorrufen (Losi et al., 2015).

In zahlreichen *In-vivo* und *In-vitro* Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Wirkung von β -Lactam-Antibiotika wie Penicillin im ZNS auf einer Suppression der GABA_A-Rezeptor vermittelten postsynaptischen Inhibition beruht (Davidoff, 1972; Wong and Prince, 1979; Sugimoto et al., 2002). Die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale werden durch Penicillin nicht beeinflusst (Schwartzkroin and Prince, 1980). Eine strukturelle Ähnlichkeit des GABA- und Penicillin-Moleküls führt zu einer konkurrierenden Wirkung beider Substanzen am GABA-Rezeptor (Curtis et al., 1972). Die konvulsiven Eigenschaften von Penicillin wurden zufällig bei der fokalen Applikation auf der Cortexoberfläche zur Infektionsprävention bei neurochirurgischen Eingriffen entdeckt. Mittlerweile stellt das Penicillin-Epilepsie-Modell eines der wichtigsten Versuchsmodelle zur Erzeugung akuter Partialanfälle sowie generalisierter Anfälle dar (Akdogan et al., 2011). Neben der systemischen Gabe von Penicillin zur Auslösung generalisierter Anfälle (Pellegrini et al., 1979) wird auch die topische Applikation am Cortex zur Erzeugung fokaler Anfälle beschrieben. Diese kann beispielsweise durch die intracortikale Injektion einer Penicillin-Lösung (Collins, 1978) oder die lokale Applikation Penicillin-getränkter Zellulose (Elger et al., 1980) erfolgen. Am Hippocampus-Modell wird Penicillin vor allem der Badlösung zugesetzt um die Erzeugung epileptischer Aktivität am gesamten Hirnschnitt zu erreichen. Insgesamt gibt es bisher wenig Verfahren, bei denen die lokale Applikation von Wirkstoffen am Hippocampus erprobt wurde (Pitkänen et al., 2005). Dingledine und Gjerstad applizierten in ausgewählten Bereichen von Hippocampus-Schnitten gezielt eine Penicillin-Lösung mit Hilfe einer Pipette (Dingledine et al., 1979). Behr und Kollegen verwendeten eine mit

einer Pumpe verbundene Glas-Hohlnadel zur lokalen Anwendung einer Hoch-Kalium-Lösung im enthorhinalen Cortex (Behr et al., 1998).

In den vorliegenden Versuchen diente die fokale Anwendung einer Penicillin-Lösung mit Hilfe einer Glaskapillare am vitalen Hippocampus-Schnitt der Erzeugung fokaler epileptischer Herde. Eine auf bestimmte Areale begrenzte Depression der GABA-vermittelten Inhibition konnte mit dieser Methode ausgelöst werden. Dieses Verfahren erlaubte die Evaluierung der Reaktion spezifischer Neuronenpopulationen des Hippocampus auf einen lokal begrenzten Reiz. So konnte ein Vergleich der spontanen und reizausgelösten Aktivität der CA1- und CA3-Nervenzellen aufgestellt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen einen kleinen Beitrag leisten auf dem Gebiet der Epileptologie, das einen ständigen außerordentlichen Fortschritt zeigt und gleichzeitig noch viele unbeantwortete Fragen aufwirft.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Gewebeschnitte

Für die Versuche wurden erwachsene, männliche Ratten des Stammes „Wistar Unilever“ (Charles River, Köln, Germany oder Hauszucht) verwendet. Das Körpergewicht der Tiere lag zwischen 300 und 400 g. Für die tierexperimentellen Untersuchungen lag die Genehmigung des Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen vor (AZ: 84-02.05.20.13.027 Kopie s. Anhang).

Zunächst wurden die Tiere mit Isofluran (AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen) in Vollnarkose versetzt und anschließend dekapitiert. Das Gehirn wurde zügig freipräpariert und in eine auf 4°C temperierte, mit Carbogen (5% CO₂ in O₂) begaste Inkubationslösung (Lösung 1 Tab.1) überführt. Die weitere Präparation erfolgte auf einer gekühlten, mit Inkubationslösung befeuchteten Metallplatte. Mit einem Skalpell wurden beide Hemisphären voneinander getrennt, um beide Hippocampi freizulegen. Die isolierten Hippocampi wurden mit Stecknadeln auf dem Präparatträger eines Gewebeschniders (McIlwain Tissue Chopper, Model TC752, Campden Instruments, Leicestershire, UK) fixiert. Dann wurden 500 µm dünne, coronale Gewebeschnitte angefertigt (Abb.1, Abb.2). Bei dieser Schnittdicke waren nach Laborerfahrung im Schnittpräparat ausreichend Nervenzellen vorhanden, um die neuronale Aktivität erfassen zu können und andererseits war eine Versorgung des Gewebes durch Diffusion möglich.

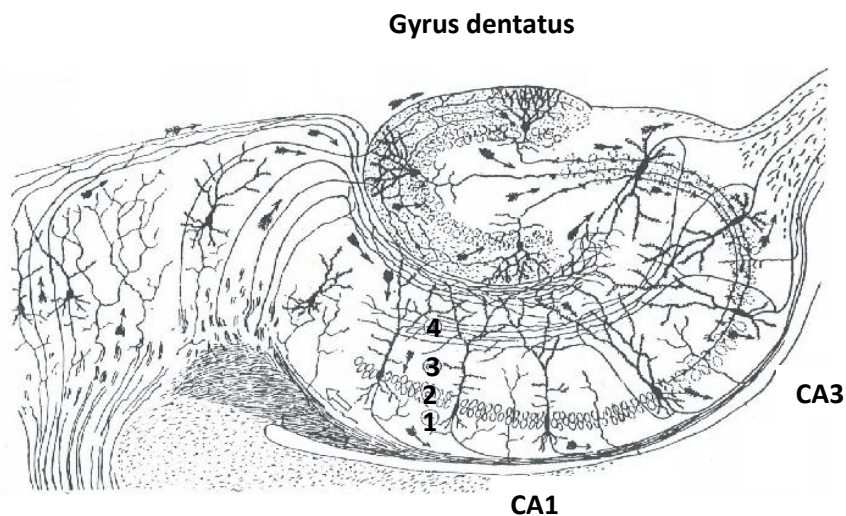


Abb.1: Schematische Darstellung eines coronalen Hippocampus-Schnittes
CA1, CA3: Regionen 1 und 3 des Cornu ammonis; 1: Stratum oriens;
2: Stratum pyramidale; 3: Stratum radiatum; 4: Stratum lacunosum moleculare
(modifiziert aus Cajal, 1911)

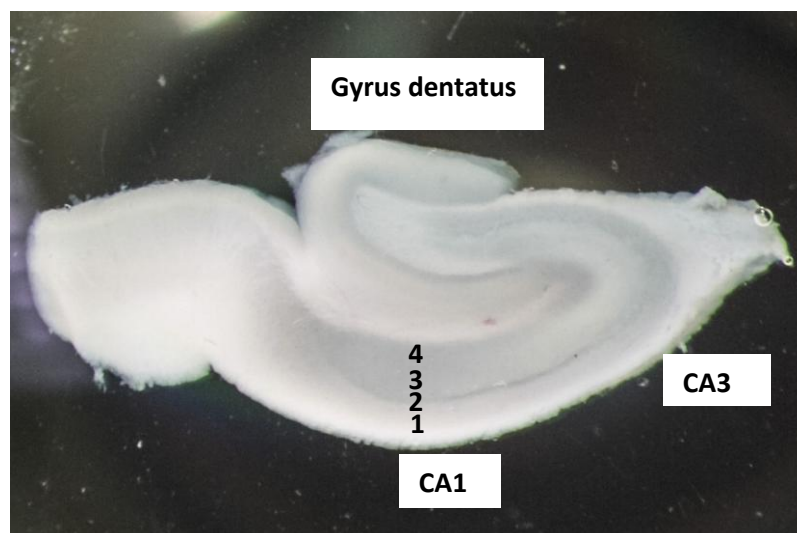


Abb.2: Fotografische Wiedergabe eines ungefärbten coronalen
Hippocampus-Schnittes in der Versuchskammer (Schnittdicke 500 µm);
CA1, CA3: Regionen 1 und 3 des Cornu ammonis; 1: Stratum oriens;
2: Stratum pyramidale; 3: Stratum radiatum; 4: Stratum lacunosum moleculare

Die Gewebeschnitte wurden dann in der Inkubationskammer auf einem feinmaschigen Kunststoffnetz platziert und dort für 45 Minuten in der auf 30°C temperierten, mit Carbogen (5% CO₂ in O₂) begasten Inkubationslösung belassen.

Anschließend wurden die Hippocampus-Schnitte in die Färbekammer überführt. Hier wurden die Schnitte in einzelnen Kompartimenten mit einem spannungssensitiven Farbstoff der Styrylgruppe (RH 795, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) eingefärbt. Jedes Kompartiment enthielt 1 ml Inkubationslösung und 12,5 µg darin gelösten Farbstoff. Die Temperatur der Lösung in der Färbekammer lag bei 30°C. Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgte unter Carbogenbegasung (5% CO₂ in O₂) und erstreckte sich über einen Zeitraum von 60 Minuten. Um die gleichmäßige Verteilung von Farbstoff und Carbogen zu gewährleisten, wurde die Färbekammer währenddessen stetig leicht gerüttelt. Der Färbeprozess fand unter Lichtausschluss statt, um ein Ausbleichen des lichtempfindlichen Farbstoffes und die Schädigung der Nervenzellen, durch die unter Lichteinfluss freigesetzten, toxischen Sauerstoffradikale, zu verhindern.

Zur Entfernung der überschüssigen, nicht gebundenen Farbstoffmoleküle wurden die Gewebeschnitte nach dem Färbeprozess erneut in die mit Inkubationslösung gefüllte Inkubationskammer verbracht. Während 45 Minuten wurden die Schnitte in der auf 30°C temperierten, mit Carbogen (5% CO₂ in O₂) begasten Inkubationslösung belassen, bevor sie mit Hilfe einer Pipette in der Versuchskammer platziert wurden.

2. Lösungen und Substanzen

2.1. Badlösungen

		NaCl	KCl	NaH ₂ PO ₄	MgSO ₄	NaHCO ₃	CaCl ₂	C ₆ H ₁₂ O ₆
1	Inkubations- lösung (ACSF)	124	4	1,24	1,3	26	2	10
2	Magnesiumfreie Inkubations- lösung (0-Mg ²⁺)	124	4	1,24	-	26	2	10

Tab.1: Zusammensetzung der Badlösungen in mmol/l

ACSF: Artificial Cerebrospinal Fluid nach Yamamoto (Yamamoto, 1972)

2.2. Penicillin-Natrium-Lösung

Zur Auslösung epileptischer Aktivität wurde aus Penicillin-G-Natriumsalz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und ACSF (*Artificial Cerebrospinal Fluid* nach Yamamoto) eine Penicillin-Natrium-Lösung in einer Konzentration von 25.000 U/ml hergestellt.

3. Kammer zur Registrierung der bioelektrischen Aktivität in vitalen Hirnschnitten

In der Versuchskammer vom „*Submerged Typ*“ (Abb.3) wurde der Hippocampus-Schnitt vollständig mit Badlösung umspült. Bei einem Kammervolumen von 1,5 ml und einer Tropfgeschwindigkeit von 4,5 ml pro Minute (90 Tropfen pro Minute) wurde die Lösung innerhalb der Kammer regelmäßig erneuert, so dass das Hirngewebe fortwährend mit ausreichend Glukose und Sauerstoff versorgt wurde. Mit Hilfe einer pH-Wert-Elektrode fand eine kontinuierliche Überprüfung des pH-Wertes der Badlösung statt. Wenn nötig, wurde die Stärke der Carbogen-Begasung angepasst, um innerhalb der Badlösung pH-Werte zwischen 7,35 und 7,5 zu erreichen. Die Temperatur in der Versuchskammer wurde durch einen Temperaturfühler registriert und mittels eines regelbaren Wärmeaustauschers konstant bei 32°C gehalten.

Oberhalb der Versuchskammer war ein Operationsmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) angebracht. Dieses ermöglichte die visuelle Identifizierung der einzelnen Hippocampusregionen und erleichterte das gezielte Platzieren der Elektroden im Hirnschnitt.

Um Übersichtsaufnahmen der jeweiligen Versuchsphasen anzufertigen, war über der Versuchskammer eine Digitalkamera (EOS D30, Canon, Krefeld, Deutschland) positioniert.

Unterhalb der Versuchskammer befand sich ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) zur optischen Registrierung von Membranpotentialänderungen in den Neuronen des Hippocampus (siehe III.5).

Um die Versuchskammer herum befanden sich Mikromanipulatoren, mit denen die Elektroden zur Auslösung und Registrierung von Feldpotentialänderungen im Hirngewebe platziert wurden (siehe III.4).

Außerdem war neben der Versuchskammer eine Endoskopkamera (Findoo Microcam, DNT, Dietzenbach, Deutschland) angebracht, welche die seitliche Ansicht auf den Gewebeschnitt ermöglichte.

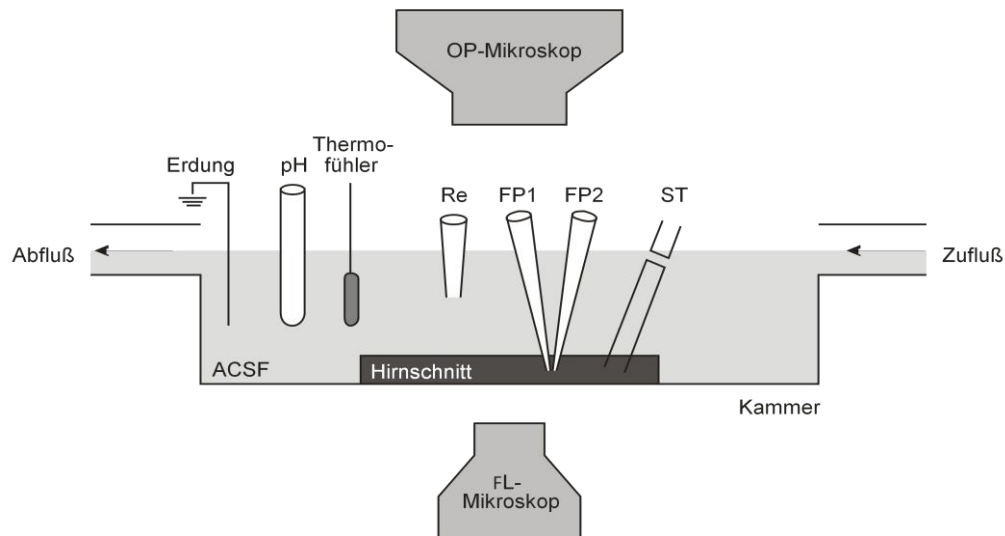


Abb.3: Kammer zur Registrierung der bioelektrischen Aktivität in Hirnschnitten mit Hilfe von konventionellen elektrophysiologischen Methoden und von spannungssensitiven Farbstoffen.

OP-Mikroskop: Operations-Mikroskop; FL-Mikroskop: Fluoreszenz-Mikroskop;

ST: Bipolare Stimulationselektrode; FP1 und FP2: Elektroden zur Ableitung der Feldpotentiale an zwei Positionen des Hirnschnitte;. Re: Referenzelektrode;

pH: Elektrode zur kontinuierlichen Messung des pH-Wertes;

ACSF: Artificial Cerebrospinal Fluid (E.-J. Speckmann, persönliche Mitteilung 2014)

4. Elektrophysiologische Verfahren zur Auslösung und Registrierung von Feldpotentialänderungen in Neuronenpopulationen

Zur elektrischen Stimulation des Hippocampus-Gewebes wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators unter mikroskopischer Sichtkontrolle eine Gabelelektrode (ST) im Stratum pyramidale der Cornu-Ammonis-3-Region platziert (Abb.4). Die Dauer der elektrischen Impulse betrug 0,1 ms. Die Reizstärke variierte zwischen 10 mA (100%), 5 mA (50%) und 1 mA (10%).

Aus Filament-Borosilikat-Glaskapillaren wurden mit Hilfe eines horizontalen Elektrodenziehgerätes (DMZ Universal Puller, Zeitz-Instrumente, München, Deutschland) Mikroelektroden zur Registrierung der bioelektrischen Nervenzellaktivität hergestellt. Die Wanddicke der Glaselektroden betrug 0,315 mm und der Innendurchmesser lag bei 0,87 mm. Die Ableitelektroden wurden luftblasenfrei mit ACSF (Lösung 1 Tab.1) gefüllt. Die Elektrodenwiderstände lagen zwischen 0,5 und 1,5 M Ω .

Mit Hilfe von Mikromanipulatoren wurde unter mikroskopischer Sichtkontrolle eine Ableitelektrode (FP1) im Stratum pyramidale der Cornu-Ammonis-1-Region und eine zweite Ableitelektrode (FP2) im Stratum pyramidale der Cornu-Ammonis-3-Region platziert (Abb.4). Zwei mit den Ableitelektroden verbundene Lautsprecher dienten der akustischen Kontrolle beim Einstechen der Ableitelektroden im Nervengewebe. Zur Ableitung der Feldpotentiale gegen eine Referenzelektrode wurde in der Versuchskammer eine KCl-Ausflusselektrode (RE) angebracht.

Die Ableit- sowie Referenzelektroden waren über KCl-/AgCl-Brücken mit Feldpotentialverstärkern verbunden. Die untere Grenzfrequenz des Verstärkers lag bei 0 Hz zur Registrierung von DC-Potentialen (Gleichspannungs-Registrierung) beziehungsweise 0,5 Hz zur Registrierung von konventionellen Potentialen (Wechselspannungs-Registrierung) und die obere Grenzfrequenz lag bei 1 kHz.

Die visuelle Darstellung auf einem Computerbildschirm und die digitale Speicherung der Feldpotentiale erfolgte mit Hilfe der Software AxoScope10

(Axon Instruments, Inverurie, Aberdeenshire, Schottland). Zusätzlich zeichnete ein Direktschreiber (Rikadenki Electronics GmbH, Freiburg im Breisgau, Deutschland) die Feldpotentiale mit einer oberen Grenzfrequenz von 1 Hz auf.

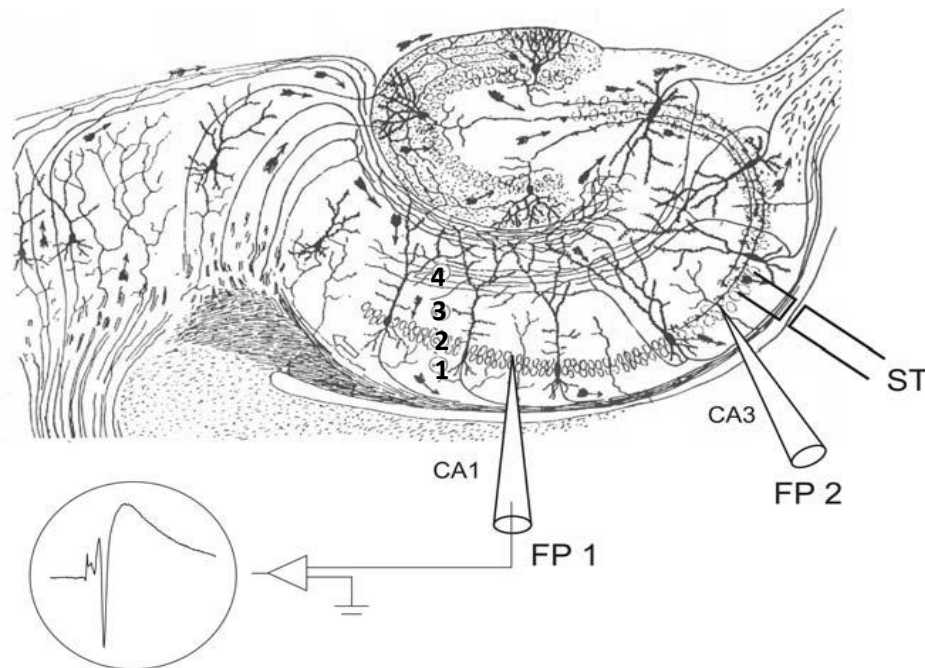


Abb.4: Darstellung des elektrophysiologischen Ableitverfahrens mit Elektroden zur Registrierung von Feldpotentialen (FP1, FP2) und zur elektrischen Stimulation (ST) am Hippocampus der Ratte und exemplarisch dafür eine abgeleitete Kurve.

CA1, CA3: Regionen 1 und 3 des Cornu ammonis; 1: Stratum oriens; 2: Stratum pyramidale; 3: Stratum radiatum; 4: Stratum lacunosum moleculare (Cajal, 1911; modifiziert nach Pasler, 2008)

5. Optische Verfahren zur Registrierung von Membranpotentialänderungen in Neuronenpopulationen

Die bildliche Darstellung des Polarisationszustandes aller Neurone innerhalb eines Nervenzellverbandes wurde durch das Färben des Gewebes mit einem spannungssensitiven Farbstoff (RH 795, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) aus der Styrylgruppe möglich.

Das Prinzip der Färbung beruht auf einer Einlagerung der Farbmoleküle in der Doppelmembran vitaler Nervenzellen (Abb.5A). Eine Veränderung der Spannungszustände im Nervengewebe verursacht eine Bewegung der Farbstoffmoleküle innerhalb der Zellmembran. Somit kommt es zu einer Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes bei Veränderung des Polarisationszustandes der Nervenzellen (Abb.5B, Abb.5C). Eine Depolarisation (Erregungszunahme) ist mit einer Abnahme der Fluoreszenz verbunden. Eine Hyperpolarisation (Erregungsabnahme) führt dagegen zu einer Zunahme der Fluoreszenz.

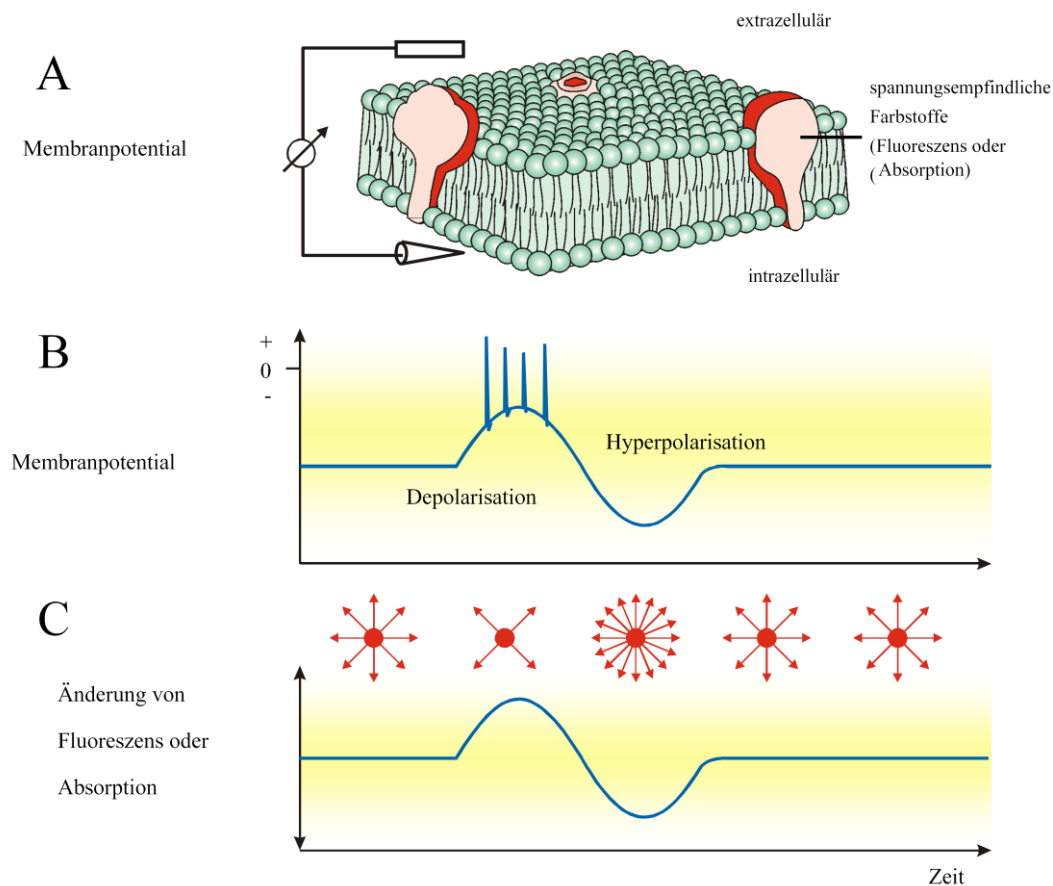


Abb.5: Prinzip der Membranpotentialregistrierung mit einem spannungssensitiven Farbstoff. A: Eingelagerter Farbstoff in der Plasmamembran; B: Änderung des Membranpotentials; C: Änderung der Fluoreszenz-Intensität (Speckmann, 2008)

Aufgrund struktureller Unterschiede des Hirngewebes findet während des Färbeprozesses eine ungleichmäßige Verteilung des Farbstoffes statt. Außerdem nimmt die Intensität der Färbung im Laufe der Versuchszeit aufgrund eines Ausbleichens und Auswaschens des Farbstoffes ab. Daher müssen die Fluoreszenzsignale immer in Relation zur Restlichtintensität (*Resting Light Intensity*, RLI) gewertet werden und während des Versuches in regelmäßigen Abständen RLI-Messungen durchgeführt werden.

Das Prinzip der Fluoreszenzregistrierung ist in Abb.6 dargestellt. Zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes wird eine Xenon-Kurzbogenlampe

(XBO 75W Osram, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Ein zwischen Anregungsquelle und Versuchskammer eingerichtetes Filtersystem ermöglicht die selektive Projektion von Lichtwellen auf den Hirnschnitt. Im ersten Schritt passiert das Licht der Anregungsquelle einen Bandpassfilter, welcher Wellenlängen über 580 nm und Wellenlängen zwischen 536 nm und 556 nm durchlässt. Das gefilterte Licht trifft dann auf einen Teilerspiegel, welcher die Wellenlängen über 580 nm passieren lässt. Die Wellenlängen unter 580 nm, also diejenigen, die den Fluoreszenzfarbstoff optimal anregen, werden vollständig vom Teilerspiegel reflektiert und im rechten Winkel auf den Hirnschnitt in der Versuchskammer geleitet. Die Farbstoffmoleküle im Gewebe werden durch das reflektierte Licht zur Fluoreszenz angeregt. Die emittierten Lichtwellen passieren einen Sperrfilter, bevor sie auf ein hexagonales, aus 464 Fotodioden bestehendes Diodenarray geleitet werden. Die Kennzeichnung des Fotodiodenarrays erfolgt durch rote Lichtpunkte, die die Mitte und die Seiten des Hexagons markieren (Abb.7; Abb. 13).

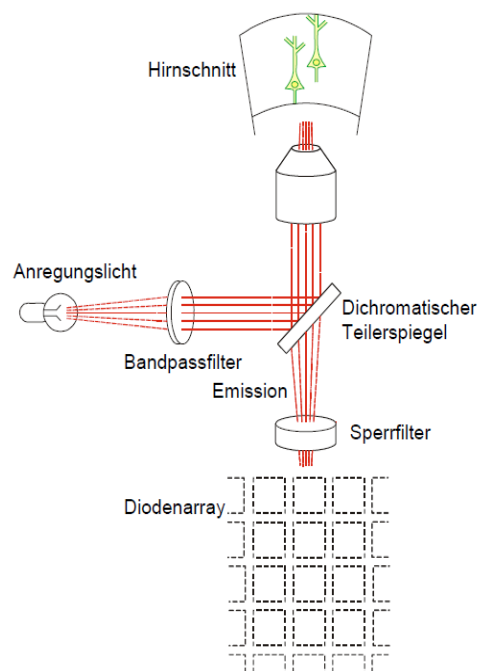


Abb.6: Schematische Darstellung des optischen Registrierverfahrens
(Speckmann, persönliche Mitteilungen)

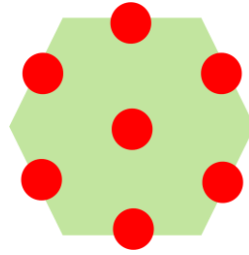


Abb.7: Darstellung des aus 464 Fotodioden bestehenden Diodenarrays (grün) mit Hilfe von Lichtpunkten (rot), die die Mitte und die Seiten des Hexagons markieren

Durch die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes entstehen bei jeder Belichtung toxische Radikale. Daher wurden, um die Schädigung des Hirnschnittes zu vermeiden, zwischen den einzelnen Belichtungsphasen Abstände von 5 Minuten eingehalten. Jede Belichtungsphase bestand aus 3 Einzelbelichtungen mit einer jeweiligen Dauer von 1300 ms. Die Ergebnisse der Fluoreszenzsignale stellen den Mittelwert der Einzelbelichtungen jeder Belichtungsphase dar. Die vom Diodenfeld registrierten Fluoreszenzsignale wurden verstärkt und über eine Analog-Digital-Wandlerkarte zur Übermittlung an einen Computer verarbeitet. Mit dem Programm Neuroplex 9.0 (Red Shirt Imaging LLC, Decatur, Georgia, USA) konnten die Spannungsveränderungen anschließend bildlich in Form einer Spannungs-Zeit-Kurve für jede Diode (Abb.8) oder in Farbcodierung als Fläche des Diodenarrays (Abb.9) dargestellt werden.

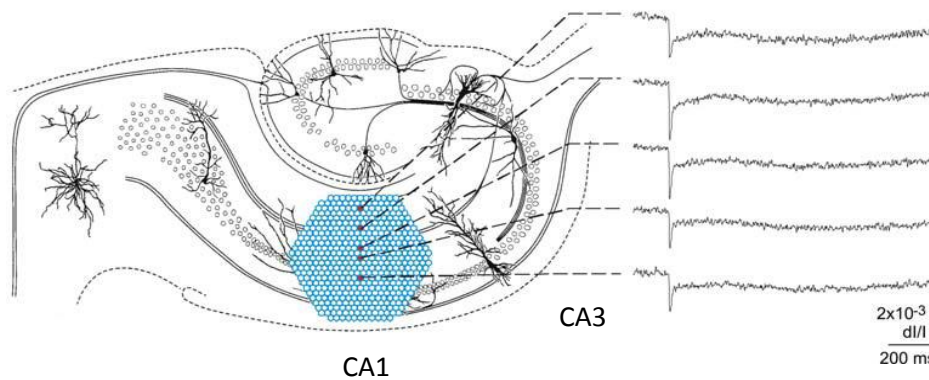


Abb.8: Darstellung der Registrierung der evozierten Spannungsveränderungen im Hippocampus-Schnitt mit Hilfe eines in der CA1-Region platzierten, hexagonalen Fotodiodenarrays (blau) mit abgeleiteter Spannungs-Zeit-Kurve für einige ausgewählte Fotodioden.

CA1, CA3: Regionen 1 und 3 des Cornu ammonis
(Speckmann, persönliche Mitteilungen)

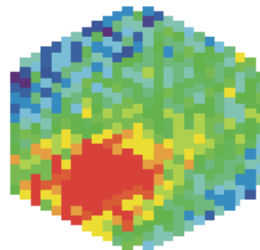


Abb.9: Darstellung der registrierten Spannungsveränderung in Farbcodierung als Fläche des Diodenarrays (Speckmann, persönliche Mitteilungen)

6. Versuchsanordnung zur Etablierung begrenzter epileptischer Herde

Ziel der Untersuchung war es, in vitalen Hirnschnitten des isolierten Hippocampus der Ratte mit einer Penicillin-Natrium-Lösung (Konzentration 25.000 U/ml) eine fokal begrenzte epileptische Aktivität zu erzeugen. Penicillin (β -Lactam-Antibiotikum) wirkt im neuronalen Gewebe als GABA_A-Rezeptorantagonist (Curtis et al., 1972). Die Bindung der Penicillinmoleküle an den GABA_A-Rezeptor ist reversibel und konzentrationsabhängig (Tsuda et al., 1994).

Die epileptischen Herde sollten in einem Teil der Versuche fokal in der CA3-Region (n=5) des Hippocampus ausgelöst werden und in dem anderen Teil der Versuche fokal in der CA1-Region (n=4).

Zur Auslösung eng begrenzter epileptischer Herde im Hirnschnitt wurde eine Filament-Borosilikat-Glaskapillare mittels einer Mikrospritze luftblasenfrei mit einer Penicillin-Natrium-Lösung (25.000 U/ml) gefüllt und am oberen Ende mit einem Hämatokrit-Kit (Vitrex, Herlev, Dänemark) verschlossen. Das Verschließen der Glaskapillare verhinderte ein Auslaufen der Lösung. Das sichere Verbleiben der Lösung in der Kapillare wurde im Vorfeld überprüft. Dazu wurden mehrere Glaskapillaren wie beschrieben gefüllt und verschlossen und nach 24 Stunden wurde der Stand des Flüssigkeitsspiegels auf ein Absinken überprüft. In keiner Kapillare war ein Flüssigkeitsverlust sichtbar.

In den Versuchen wurde die Glaskapillare dann unter mikroskopischer Sichtkontrolle gezielt mit Hilfe eines neben der Versuchskammer angebrachten Mikromanipulators auf dem Hippocampus-Präparat platziert, so dass eine Diffusion der Penicillin-Moleküle aus der Kapillare in ein begrenztes Areal der Hirnschnitte ermöglicht wurde. Um den Moment der Berührung zwischen Kapillare und Hirnschnitt besser beurteilen zu können, wurde bei diesem Versuchsschritt zusätzlich eine Endoskopkamera (Findoo Microcam, DNT, Dietzenbach, Deutschland) in die Versuchskammer eingetaucht, so dass auch

eine seitliche Ansicht des Gewebeschnittes möglich war (Abb.10). Mit dieser Methode konnte eine gezielte, räumlich eng begrenzte, konstante Diffusion der Penicillin-Natrium-Lösung in das Hippocampus-Gewebe gewährleistet werden.

In beiden Versuchsreihen wurde die Aktivität der Nervenzellen in der CA1-Region sowie in der CA3-Region erfasst. In jeder Versuchsphase wurden die Spontanaktivität, die evozierten Feldpotentiale und die Fluoreszenzsignale des Nervenzellverbandes registriert.

Die Registrierung der bioelektrischen neuronalen Aktivität erfolgte über Ableitelektroden (FP1, FP2), welche in der unmittelbaren Umgebung der mit Penicillin gefüllten Kapillare platziert waren (Abb.11). Das Diodenarray erfasste über zwei unterschiedliche Positionen die Fluoreszenzsignale und somit den Polarisationszustand der Neurone in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus (Abb.11).

Die genaue Feststellung der räumlichen Ausdehnung des epileptischen Focus war nur mit Hilfe des spannungssensitiven Farbstoffes möglich. Die evozierten Feldpotentiale gaben zwar einen groben Überblick über die aktuelle neuronale Aktivität während der unterschiedlichen Versuchsphasen, konnten aufgrund ihrer weitreichenden räumlichen Ausdehnung aber nicht zu einer verlässlichen Aussage bezüglich der fokalen Begrenzung der epileptischen Herde herangezogen werden.

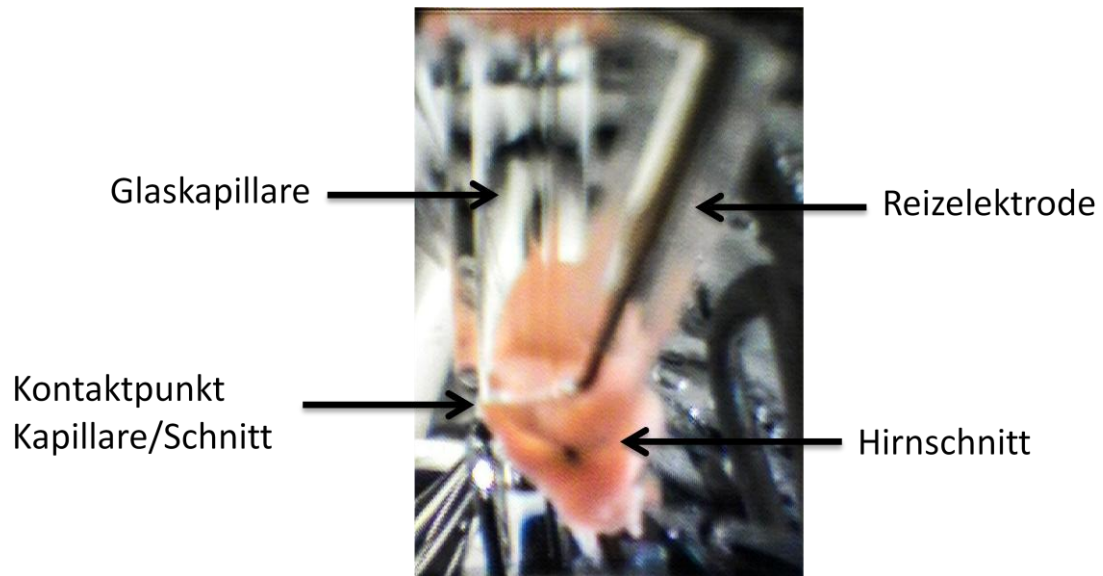


Abb.10: Fotografische Wiedergabe der seitlichen Ansicht auf den Gewebeschnitt durch eine Endoskopkamera

Eine mechanische Beeinträchtigung des Nervengewebes durch das Positionieren der Glaskapillare auf dem Hirnschnitt und eine dadurch bedingte Veränderung der Messwerte musste ausgeschlossen werden. Daher wurde für jede Versuchsreihe ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem eine mit ACSF gefüllte Glaskapillare auf dem Schnitt platziert wurde.

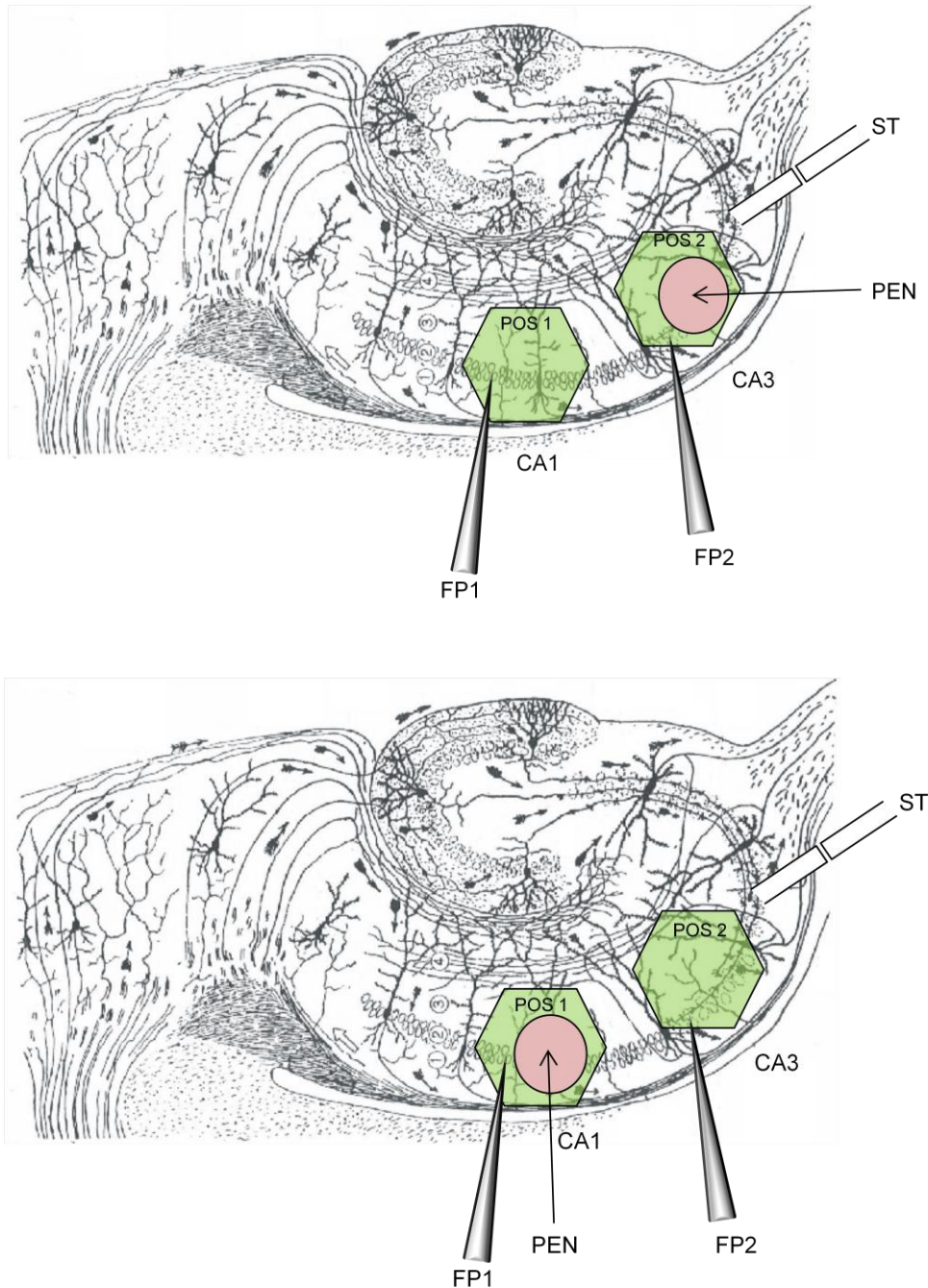


Abb.11: Schematische Darstellung des im Hippocampus-Schnitt platzierten Diodenarrays (grün) und der Glaskapillare (rot) (modifiziert aus Cajal, 1911)

oben: Glaskapillare in der CA3-Region

unten: Glaskapillare in der CA1-Region

CA1, CA3: Regionen 1 und 3 des Cornu ammonis; ST: Stimulationselektrode;

FP1, FP2: Elektroden zur Ableitung der Feldpotentiale in der CA1- und CA3-Region;

PEN: Penicillin-gefüllte Glaskapillare; POS1, POS2: Position des Diodenarrays in der CA1- und CA3-Region

7. Versuchsprotokoll

Der zeitliche Ablauf der Versuche ist in Abb.12 wiedergegeben. Die Versuche gliederten sich in die folgenden Versuchsphasen:

- 1) Während der **Kontrollphase-1 (CTRL1; 30 Minuten)** wurde der Hippocampusschnitt in der Versuchskammer mit Badlösung (Lösung 1 Tab.1) umspült. Diese Versuchsphase diente der Darstellung der Neuronenaktivität vor Applikation einer epileptogen wirkenden Substanz.
- 2) In der **Penicillin-Phase (PEN; 60 Minuten)** wurde die mit Penicillin-Lösung (25.000 U/ml) gefüllte Glaskapillare gezielt auf dem Schnittpräparat platziert (Versuchreihe 1 in der CA3-Region; Versuchsreihe 2 in der CA1-Region). Der Schnitt wurde dabei mit ACSF (Lösung 1 Tab.1) umspült. Während dieser Versuchsphase wurde die Antwort der Nervenzellen in der CA1- und CA3-Region auf die Applikation des Penicillins in der CA1- oder CA3-Region registriert.
- 3) Für die **Kontrollphase-2 (CTRL2; 30 Minuten)** wurde die Penicillin-Kapillare vom Schnitt entfernt. Der Schnitt wurde mit ACSF (Lösung 1 Tab.1) umspült. In dieser Versuchsphase wurde getestet, ob eine vorher ausgelöste epileptische Aktivität durch Auswaschen des Penicillins reversibel war.

- 4) Danach wurde der Schnitt während der **magnesiumfreien-Phase (0-Mg; 60 Minuten)** in der Versuchskammer mit magnesiumfreier Badlösung (Lösung 2 Tab.1) umspült. Da physiologischerweise im Ionenkanal des Glutamat-Rezeptors vom NMDA-Typ eine Blockierung durch ein Magnesium-Ion besteht (von Engelhardt und Breves, 2000), wird die Epileptogenität des Gewebes durch den Magnesium-Entzug gesteigert. Diese Versuchsphase diente dazu, festzustellen, ob das Gewebe unabhängig von der fokalen Penicillin-Applikation grundsätzlich in der Lage war, epileptische Aktivität zu produzieren.

- 5) Während der Hirnschnitt mit magnesiumfreier Badlösung (Lösung 2 Tab.1) umspült wurde, wurde in der **Magnesiumfreien-Penicillin-Phase (0-Mg+PEN; 30 Minuten)** die mit der Penicillin-Lösung gefüllte Glaskapillare auf dem Schnittpräparat positioniert (Versuchsreihe 1 in der CA3-Region; Versuchsreihe 2 in der CA1-Region). Diese Versuchsphase hatte zum Ziel, die Wirkung zweier epileptogen wirkenden Maßnahmen am GABA_A- bzw. NMDA-Rezeptor auf die Aktivität der Nervenzellen darzustellen.

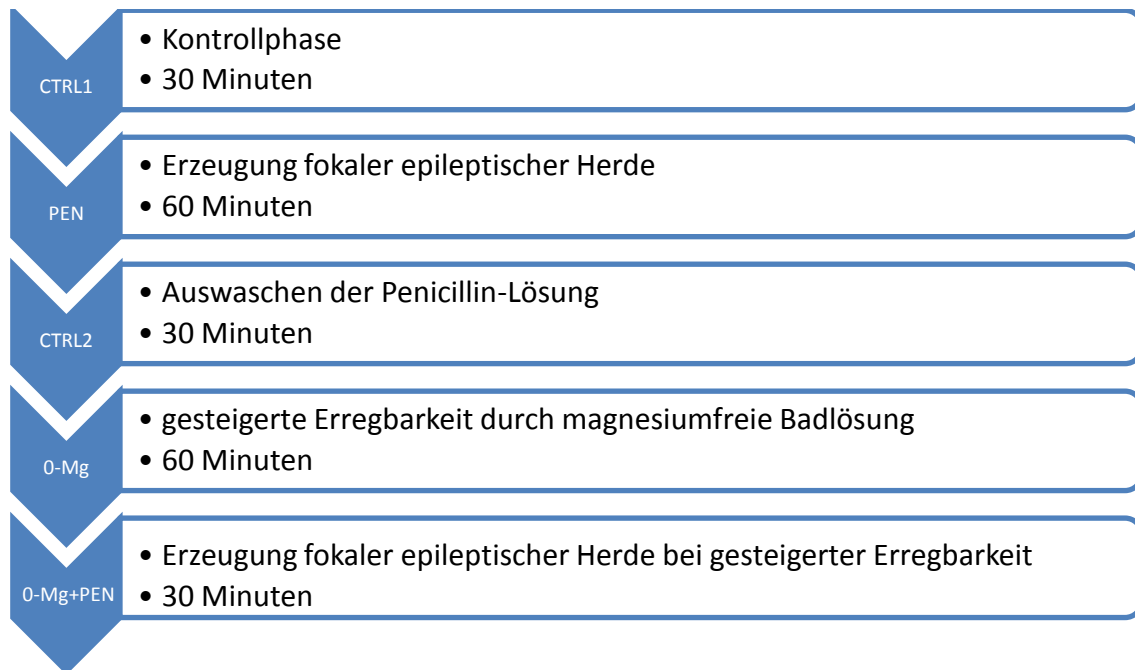


Abb.12: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls

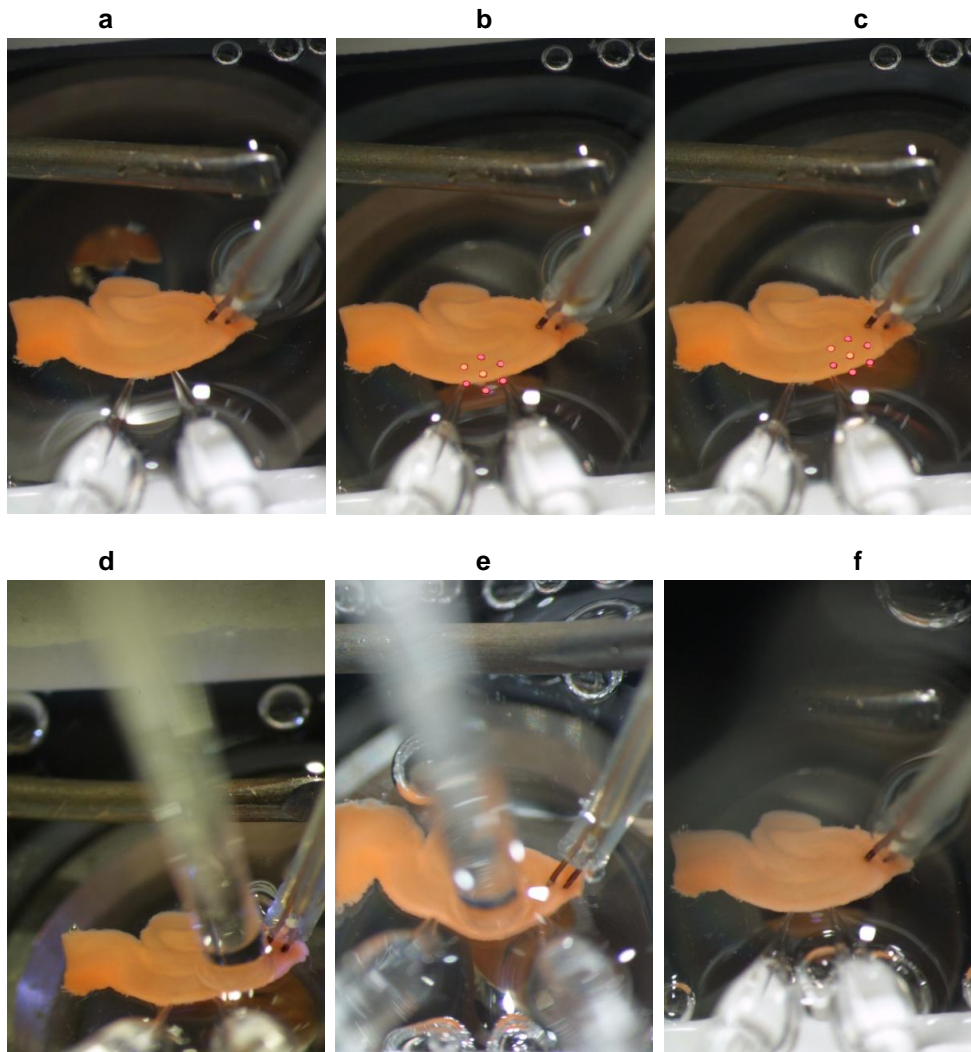


Abb.13: Fotografische Wiedergabe des Hippocampus-Schnittes in der Versuchskammer

a: Position der Elektroden für die elektrische Reizung und für die Ableitung der Feldpotentiale

b: Position des Diodenarrays zur Registrierung der Fluoreszenzsignale in der CA1-Region

c: Position des Diodenarrays zur Registrierung der Fluoreszenzsignale in der CA3-Region

d: Position der Glaskapillare (gefüllt mit Penicillin) in der CA3-Region (Versuchsreihe 1)

e: Position der Glaskapillare (gefüllt mit Penicillin) in der CA1-Region (Versuchsreihe 2)

f: Hippocampus-Schnitt nach Entfernen der Glaskapillare

8. Verfahren zur Auswertung und Darstellung der Messergebnisse

Zur Auswertung der Penicillin-induzierten Spontanaktivität am Hippocampus (Abb.14) wurden aus den Originalregistrierungen repräsentative Abschnitte für die jeweiligen Versuchsphasen ausgewählt. Um die Amplitude der spontanen Feldpotentiale messen zu können, wurde eine Ausgleichsgerade (gestrichelte schwarze Linie) durch die Grundlinie gezogen. Ausgehend von dieser Gerade wurde die maximale Amplitude (A) der Spontanentladungen bestimmt. Zur Ermittlung der Entladungsdauer wurde auf Höhe der halben Amplitude (A/2) die Breite (B) des Potentials gemessen.

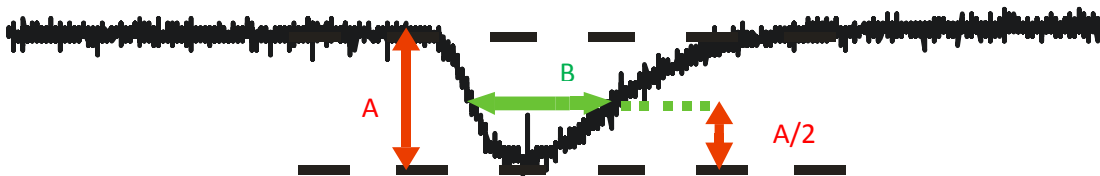


Abb.14: Schematische Darstellung der Messung der Spontanaktivität des Hippocampus

A: maximale Amplitude der Entladung (mV);

A/2: Halbe Höhe der maximalen Amplitude (mV);

B: Entladungsdauer auf halber Höhe der Amplitude (ms)

Zur Auswertung der evozierten Feldpotentiale (Abb.15) wurden die Amplitude (A) des Population-Spikes (gestrichelte rote Linie) und die Dauer der Entladung (B) bis zur Rückkehr auf die Grundlinie ausgemessen (gestrichelte grüne Linie). Die Messung der Amplitude des Population Spikes erfolgte mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden (schwarze gestrichelte Linie).

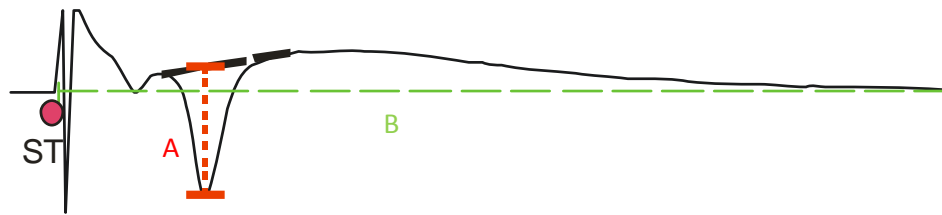


Abb.15: Schematische Darstellung der Messung der evozierten Feldpotentiale

A: Amplitude des Population Spike (mV); B: Dauer des evozierten Potentials;

ST: Zeitpunkt der Reizauslösung

Die Fluoreszenzveränderung wurde zum einen in Form einer Kurve als Funktion der Zeit dargestellt. Für die 4 Schichten des Hippocampus (Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum, Stratum lacunosum moleculare) wurde je eine repräsentative Diode für die verschiedenen Versuchsphasen ausgewählt. Zur Ausmessung der Amplitude der Fluoreszenzsignale (Abb.16) wurde durch den Bereich der Kurve vor der Reizung eine Ausgleichsgerade (schwarze gestrichelte Linie) gezogen. Ausgehend von dieser Gerade wurde die maximale Fluoreszenzveränderung innerhalb der ersten 25 ms nach Reizauslösung und die Fluoreszenzveränderung 250 ms nach Reizauslösung dargestellt. Da die Fluoreszenzveränderung in den verschiedenen Versuchsphasen in allen Schichten des Hippocampus ähnlich war, wurden die Messungen exemplarisch an der Kurve einer für das Stratum radiatum repräsentativen Diode vorgenommen. Bei den gemessenen Werten handelt es sich um relative Werte, da die Signale als Fluoreszenzabnahme in Relation zur Restlichtintensität definiert sind.

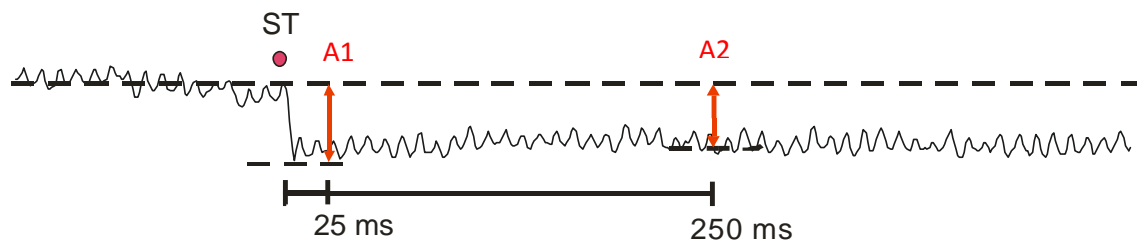


Abb.16: Schematische Darstellung der Messung der optischen Signale

A1: maximale Amplitude (mV) der Fluoreszenzveränderung innerhalb der ersten 25 ms nach Reizauslösung; A2: Amplitude (mV) der Fluoreszenzveränderung 250 ms nach

Reizauslösung; ST: Zeitpunkt der Reizauslösung

Zur Darstellung der räumlichen Ausbreitung der Reizantwort innerhalb des Neuronenverbandes wurden die Signale aller Dioden in Farbcodierung als Fläche des hexagonalen Diodenarrays dargestellt (Abb. 17). Die zunehmende Erregung der Nervenzellen manifestierte sich in einer Veränderung der Färbung von blau über gelb zu rot. Für alle Abbildungen im Ergebnisteil (IV) stellt das erste Hexagon den Zeitpunkt der Reizauslösung dar. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen beträgt 5 ms. Im Vergleich zur fotografischen Wiedergabe des Arrays im Gewebeschnitt (Abb. 13) ist jedes abgebildete Array um die Längsachse gespiegelt.

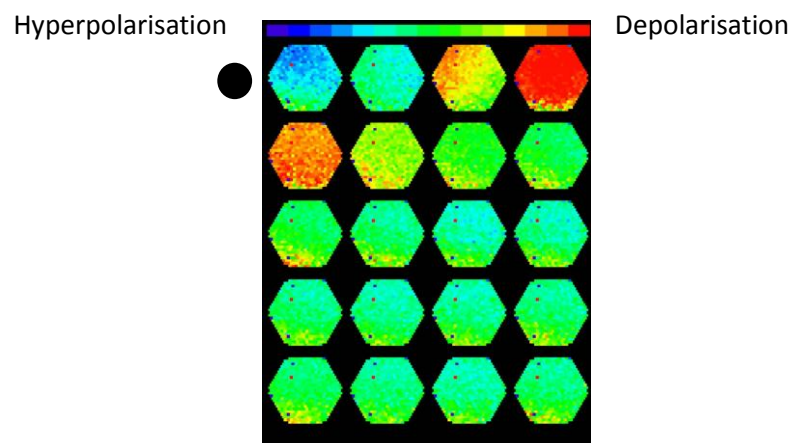


Abb.17: Darstellung der Ausbreitung der Reizantwort im Neuronenverband in Farbcodierung als Fläche des Diodenarrays

Schwarzer Punkt: Zeitpunkt der Reizung

Zeitliche Folge der einzelnen Hexagone: von links nach rechts und von oben nach unten

Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen: 5 ms

9. Histologie

Zur Anfertigung histologischer Kontrollen wurden die Hippocampus-Schnitte nach den Versuchen in Zamboni-Lösung (Paraformaldehyd, Pikrinsäure, Phosphatpuffer) fixiert. Die histochemische Analyse wurde durch Herrn Dr. Hans Bidmon am Cécile und Oskar Vogt-Institut für Hirnforschung des Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführt.

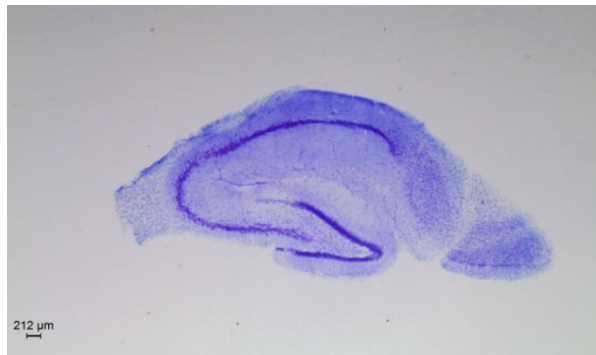


Abb.18: Fotografische Wiedergabe eines fixierten und gefärbten Hippocampus-Schnittes (Nissl-Färbung)

IV. ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Experimente war die Untersuchung der Wirkung einer lokalen Penicillin-Anwendung (Versuchsanordnung siehe III.6) in den Regionen CA1 und CA3 des Hippocampus auf die Spontanaktivität sowie auf die durch elektrische Reizung hervorgerufene Aktivität in den Nervenzellverbänden dieser beiden Regionen. Das spontane Verhalten der Neurone wurde anhand einer kontinuierlichen Registrierung der Feldpotentiale beurteilt. Das Ausmaß der elektrisch evozierten Aktivität wurde, wie in den Kapiteln III.4 und III.5 beschrieben, mittels der Registrierung der Feldpotentiale und der Fluoreszenzsignale bestimmt. Die Kombination beider Methoden erlaubte die Darstellung der Intensität der provozierten neuronalen Reizantwort und außerdem der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung im Nervenzellverband der CA1- und CA3-Regionen. Jeder Versuch gliederte sich, wie in Kapitel III.7 aufgeführt, in jeweils fünf Phasen. Dieser Versuchsablauf ermöglichte einerseits die Visualisierung der neuronalen Aktivität vor, während und nach der Penicillin-Anwendung. Andererseits konnte die Wirkung des Penicillins bei einer durch Magnesiumentzug hervorgerufenen, gesteigerten neuronalen Erregbarkeit dargestellt werden.

Im Vorfeld wurde für beide Versuchsreihen (Penicillin-Anwendung in CA1 respektive in CA3) jeweils ein Kontrollversuch durchgeführt. Dabei wurde eine mit ACSF gefüllte Kapillare auf dem Hirnschnitt positioniert, um den möglichen Einfluss einer rein mechanisch bedingten Reizung des Gewebes auf die Messwerte einzuschätzen. In keinem Fall führte das Platzieren der ACSF-Kapillare zum Entstehen spontaner epileptiformer Entladungen. Im Hinblick auf die reizausgelöste Aktivität wurde teils eine geringgradige Beeinflussung der registrierten Feldpotentiale und Fluoreszenzsignale festgestellt. Allerdings wurden die Veränderungen der Messwerte als unwesentlich (innerhalb der physiologischen Varianz) eingestuft. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die nachfolgend dargestellten Variationen der Messwerte auf einer reinen Wirkung der Penicillin-Natrium-Lösung beruhen.

1. Penicillin-induzierte Wirkung auf die Spontanaktivität der Nervenzellen im Hippocampus

1.1. Versuchsreihe 1: Penicillin-Anwendung in CA3 (n=5)

Die **erste Versuchsphase** (Kontrollphase-1; CTRL1) diente der Erfassung der Grundaktivität der Nervenzellen in den Regionen CA1 und CA3 über einen Zeitraum von 30 Minuten. In den meisten Fällen waren während dieser Phase keine spontanen Entladungen zu sehen (n=4). Vereinzelt zeigte sich aber auch ohne Epilepsie-auslösende Maßnahmen eine erhöhte Grundaktivität im Hirnschnitt (n=1; Abb. 19).

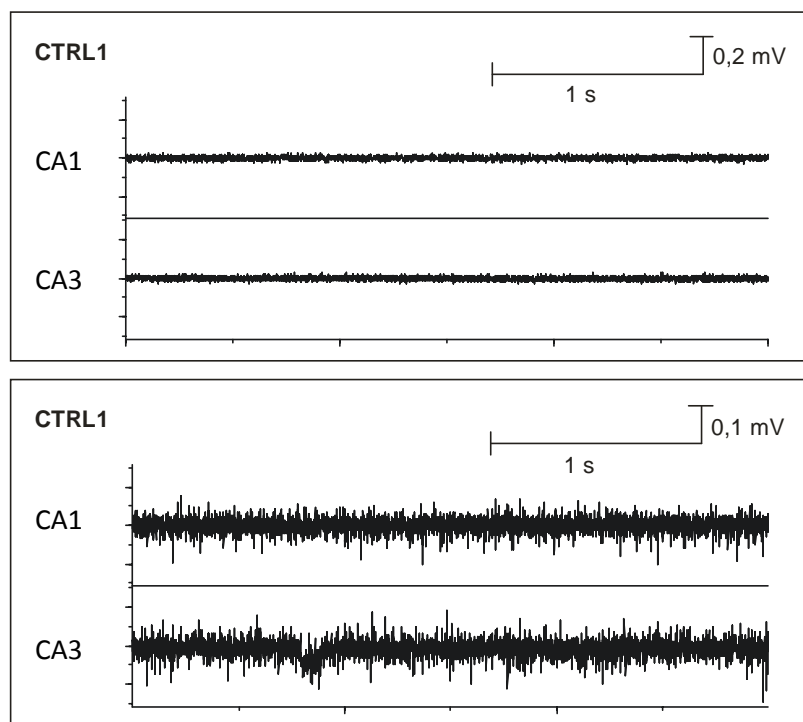


Abb. 19: Ausschnitte aus der Originalregistrierung der spontanen bioelektrischen Signale in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus während der Kontrollphase-1; oben keine spontane Entladungen, unten mit erhöhter Grundaktivität in CA3.
CTRL1: Kontrollphase-1 vor lokaler Penicillin-Anwendung (Badlösung=ACSF)

Während der **zweiten Versuchsphase** (Penicillin-Phase; PEN) wurde unter lokaler Applikation einer Penicillin-Lösung in der CA3-Region 60 Minuten lang die spontane Neuronenaktivität in CA1 und CA3 registriert. In der Mehrzahl der Versuche löste die lokale Penicillin-Anwendung in CA3 das Entstehen spontaner epileptiformer Entladungen in der CA3-Region aus (n=3; Abb. 20). In einigen Fällen kam es zu einer orthodromen Weiterleitung der in der CA3-Region generierten bioelektrischen Aktivität in die CA1-Region (n=2), so dass dort zeitlich gekoppelte Spontanentladungen sichtbar waren. Bei einer fehlenden orthodromen Weiterleitung der Spontanentladungen von der CA3- in die CA1-Region konnte eine fehlerhafte Präparation mit Durchtrennung der Schaffer-Kollateralen ausgeschlossen werden, da in einer späteren Versuchsphase in beiden Regionen synchron auftretende Nervenzellaktivität vorhanden war. Bei fehlender Entstehung Penicillin-induzierter Spontanentladungen (n=1) zeigte sich später im Versuch während des Magnesiumentzuges, dass die grundsätzliche Bereitschaft des Gewebes, epileptische Aktivität zu produzieren, vorhanden war. Bei einer initial bestehenden erhöhten intrinsischen Grundaktivität während der Kontrollphase-1 führte die fokale Penicillin-Applikation in der CA3-Region zu einer messbaren Verkleinerung der Spontanentladungen (n=1).

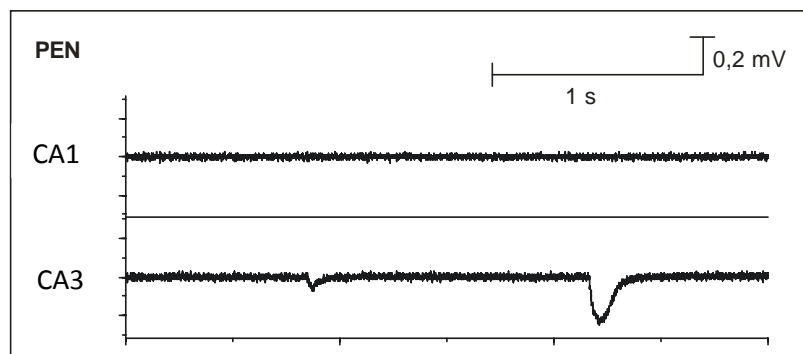


Abb. 20: Ausschnitte aus der Originalregistrierung der spontanen bioelektrischen Signale in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus während der Penicillin-Phase; epileptiforme Spontanentladungen in CA3.

PEN: Glaskapillare (gefüllt mit Penicillin) in der CA3-Region (Badlösung=ACSF)

Während der **dritten Versuchsphase** (Kontrollphase-2; CTRL2) wurde der Hirnschnitt 30 Minuten lang von Badlösung (ACSF) umspült, um verbleibende Penicillin-Moleküle aus dem Gewebe zu entfernen. In allen Versuchen, in denen ein durch die lokale Penicillin-Applikation in CA3 hervorgerufener Effekt auftrat, war dieser durch Auswaschen der Lösung reversibel (n=4). Durch Penicillin hervorgerufene spontane Entladungen sistierten oder waren zumindest in ihrer Amplitude deutlich verringert (n=3). In dem Versuch, in dem die Penicillin-Anwendung zu einer verkleinerten Amplitude der initial bestehenden spontanen Entladungen geführt hatte, kam es während des Auswaschens zu einem Anstieg der Amplitudenwerte im Vergleich zur Penicillin-Phase (n=1).

In der **vierten Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Phase; 0-Mg) wurden die Hippocampus-Schnitte für eine Dauer von 60 Minuten mit einer magnesiumfreien künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit umspült. Das Fehlen von Magnesium-Ionen in der Badlösung begünstigte eine Steigerung der Erregbarkeit des Hirngewebes. Die physiologischerweise bestehende Blockade der Ionenkanäle der Glutamat-Rezeptoren vom NMDA-Typ durch Magnesium-Ionen wurde dadurch gelöst. In dieser Versuchsphase konnte somit festgestellt werden, ob das untersuchte Gewebe unabhängig von einer Penicillin-Anwendung grundsätzlich zur Generierung epileptischer Aktivität in der Lage war. In den meisten Fällen traten bei gesteigerter Erregbarkeit des Nervengewebes durch Umspülen des Hirnschnittes mit magnesiumfreier Badlösung typische epileptiforme, regelmäßige und synchrone Spontanentladungen in der CA1- und CA3-Region auf (n=3; Abb. 21). In jedem dieser Versuche kam es zum Entstehen zusätzlicher einzelner spontaner Entladungen in der CA3-Region (n=3). In einem Versuch waren regelmäßige, spontane Entladungen nur in der CA3-Region vorhanden (n=1). In einem anderen Versuch waren regelmäßige Spontanentladungen nur in der CA1-Region sichtbar (n=1).

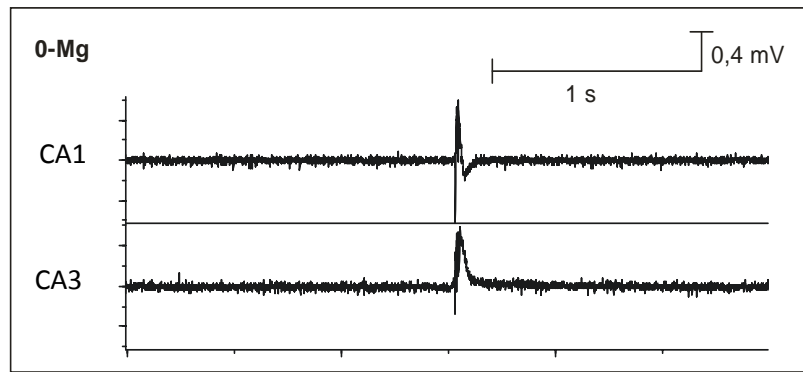


Abb. 21: Ausschnitte aus der Originalregistrierung der spontanen bioelektrischen Signale in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus während der Magnesiumfreien-Phase; epileptiforme, synchrone Spontanentladungen in CA1 und CA3.

0-Mg: Steigerung der neuronalen Erregbarkeit (magnesiumfreie Badlösung)

Während der **letzten Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Penicillin-Phase; 0-Mg+PEN) wurde zur Erzeugung begrenzter epileptischer Herde bei gesteigerter Erregbarkeit des Gewebes, die mit Penicillin gefüllte Glaskapillare erneut für 30 Minuten in CA3 positioniert. In zwei von drei Versuchen führte die zusätzliche fokale Penicillin-Applikation zu einer Reduktion der Potentialamplituden der in der CA1- und CA3-Region synchron auftretenden Spontanentladungen (n=2). In einem anderen Versuch war unter Penicillin-Einfluss keine Veränderung Spontanaktivität in CA1 und CA3 sichtbar (n=1). In den beiden Versuchen, in denen die spontanen Entladungen während der Magnesiumfreien-Phase nur in jeweils einer Region aufgetreten waren, kam es bei Zugabe von Penicillin in CA3 zu einer vollständigen Unterdrückung dieser spontanen Entladungen (n=2).

1.2. Versuchsreihe 2: Penicillin-Anwendung in CA1 (n=4)

Auch in der zweiten Versuchsreihe war während der **ersten Versuchsphase** (Kontrollphase-1; CTRL1) ohne Anwendung epileptogen wirkender Maßnahmen in manchen Fällen eine erhöhte intrinsische Grundaktivität zu verzeichnen (n=3; Abb. 22).

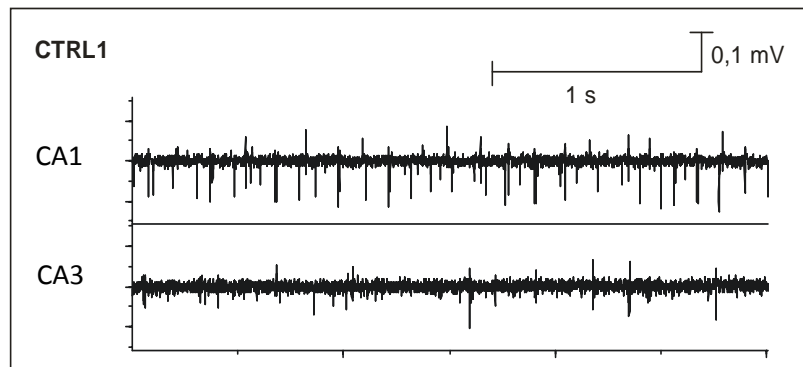


Abb. 22: Ausschnitte aus der Originalregistrierung der spontanen bioelektrischen Signale in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus während der Kontrollphase-1; erhöhte Grundaktivität.

CTRL1: Kontrollphase-1 vor lokaler Penicillin-Anwendung (Badlösung=ACSF)

Die lokale Penicillin-Anwendung in der CA1-Region während der **zweiten Versuchsphase** (Penicillin-Phase; PEN) führte in der Hälfte von insgesamt vier Versuchen zu einer Reaktion der Nervenzellen sowohl in CA1 als auch in CA3 (n=2). In diesen Versuchen war schon während der Kontrollphase-1 eine erhöhte Grundaktivität mit in CA1 oder CA3 einzeln oder auch synchron auftretenden spontanen Entladungen sichtbar. Während der Penicillin-Phase waren viele dieser Spontanentladungen in der Amplitude vergrößert und in der Entladungsdauer verlängert (Abb. 23). Ein auf die CA1-Region begrenztes Entstehen epileptiformer Spontanentladungen durch die Penicillin-Anwendung in CA1 manifestierte sich nur einmalig (n=1). In diesem Versuch war allerdings während keiner Versuchsphase spontane Aktivität in CA3 zu verzeichnen, so dass ein rein lokaler Effekt nicht mit Sicherheit bestätigt werden konnte. Es kam auch vor, dass eine Penicillin-bedingte Wirkung auf die Nervenzellen nur in der CA3-Region sichtbar war (n=1). Die dort schon während der Kontrollphase-1

auffallenden Spontanentladungen zeichneten sich während der Penicillin-Applikation in CA1 durch eine vergrößerte Amplitude aus und traten in kürzeren Abständen auf.

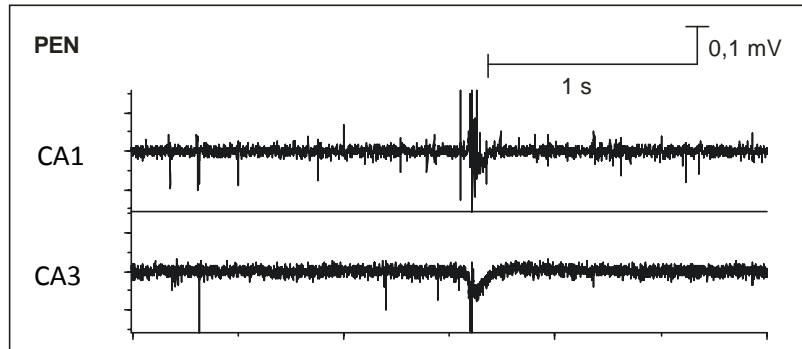


Abb. 23: Ausschnitte aus der Originalregistrierung der spontanen bioelektrischen Signale in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus während der Penicillin-Phase; synchrone epileptiforme Spontanentladungen in CA1 und CA3.

PEN: Glaskapillare (gefüllt mit Penicillin) in der CA1-Region (Badlösung=ACSF)

Im Gegensatz zur Versuchsreihe 1 (Penicillin-Anwendung in CA3) war in der Versuchsreihe 2 während der **dritten Versuchsphase** (Kontrollphase-2; CTRL2) ein durch Penicillin-Anwendung in der CA1-Region hervorgerufener Effekt nicht immer, sondern nur in zwei von vier Fällen reversibel (n=2). Es kam nach Entfernen der Penicillin-Kapillare teilweise zu einer zusätzlichen Steigerung der spontanen Nervenzellaktivität im Vergleich zur Penicillin-Phase (n=1).

Die Superfusion der Hirnschnitte mit magnesiumfreier Badlösung in der **vierten Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Phase; 0-Mg) führte auch in dieser Versuchsreihe teils zum Entstehen typischer, epileptiformer, synchroner Spontanentladungen in CA1 und CA3 (n=2). Hierbei waren zum Teil zusätzliche, einzelne Entladungen in der CA1-Region sichtbar (n=1). Einmalig entstanden regelmäßige, spontane Entladungen nur in der CA1-Region (n=1). Ein anderes Mal traten spontane Entladungen nur in der CA3-Region auf (n=1).

Ein zusätzliches Platzieren der Penicillin-Kapillare in der CA1-Region zur Erzeugung begrenzter epileptischer Aktivität bei gesteigerter Erregbarkeit der Hirnschnitte während der **letzten Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Penicillin-Phase; 0-Mg+PEN) war mehrfach mit einer Verstärkung der in der CA1-Region registrierten spontanen Potentiale verbunden (n=2). In dem Fall, in dem während der Magnesiumfreien-Phase keine Spontanentladungen in der CA1-Region registriert wurden, kam es nun unter Penicillin-Anwendung zu sichtbaren spontanen Entladungen (n=1). Im Einzelfall blieben die in CA1 registrierten spontanen Signale in ihrer Stärke unverändert (n=1). Die in der CA3-Region registrierten spontanen Entladungen waren gleichbleibend (n=2) oder leicht verringert (n=1). Das Vorliegen einer möglichen Diffusion der Penicillin-Lösung in die CA3-Region erschien unwahrscheinlich, da in diesem Fall aufgrund der orthodromen Weiterleitung der bioelektrischen Aktivität eine gleiche Tendenz in CA3 und CA1 zu erwarten gewesen wäre.

2. Penicillin-induzierte Wirkung auf die reizausgelöste Aktivität der Nervenzellen im Hippocampus

2.1. Versuchsreihe 1: Penicillin-Anwendung in CA3 (n=5)

Die **erste Versuchsphase** (Kontrollphase-1; CTRL1) diente der Registrierung der reizausgelösten Aktivität der Nervenzellverbände der CA1- und CA3-Region bei unterschiedlichen Reizintensitäten (100%, 50%, 10%) zur Ermittlung der Ausgangswerte. Die evozierten Feldpotentiale sowie die Fluoreszenzsignale als Spannungs-Zeit-Kurven wurden, wie im Kapitel III.8 erläutert, anhand der maximalen Potentialamplitude und der Entladungsdauer bewertet.

Die lokale Penicillin-Anwendung in der CA3-Region während der **zweiten Versuchsphase** (Penicillin-Phase; PEN) bewirkte in allen fünf Versuchen bei mindestens einer Reizintensität das Auftreten von typischen, epileptiformen Nachentladungen in der CA3-Region (n=5). Teilweise waren diese mit gleichzeitigen Nachentladungen in der CA1-Region als Zeichen orthodromer Fortleitung der in CA3 generierten Neuronenaktivität verbunden (n=2; Abb.24). Die in der CA3-Region registrierten Potentialamplituden der evozierten Feldpotentiale veränderten sich durch die Penicillin-Anwendung nicht einheitlich. Die unterschiedlichen Reizstärken konnten unabhängig von dem Vorkommen der Nachentladungen entweder mit einer Vergrößerung oder einer Verkleinerung der Potentialamplituden verbunden sein. In allen Fällen kam es aber mindestens bei einer Reizstärke zu einer Vergrößerung der in CA3 registrierten Feldpotentialamplituden (n=5; Abb. 24). Auch in der CA1-Region kam es nicht zu einer einheitlichen Veränderung der maximalen Potentialamplituden. Allerdings kam es hier nach der Penicillin-Anwendung in CA3 in der Mehrzahl der insgesamt fünf Versuche zu einer Verkleinerung der registrierten Feldpotentiale bei mehr als einer Reizstärke (n=4).

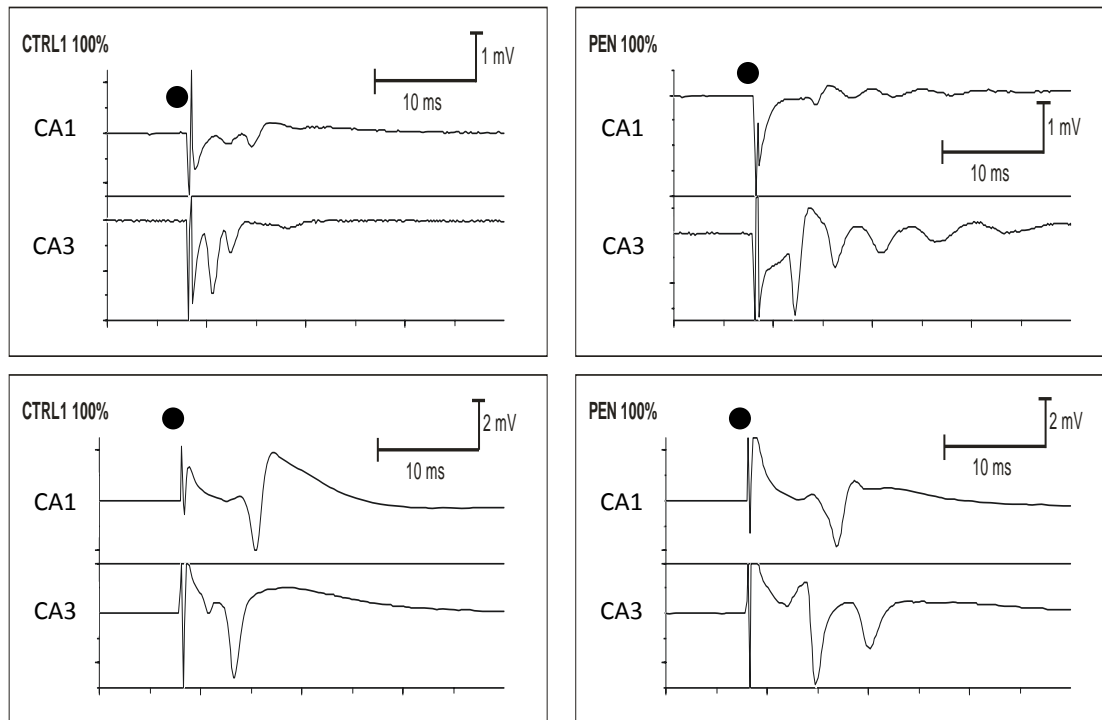


Abb. 24: Originalregistrierung der evozierten Feldpotentiale in der Kontrollphase-1 (CTRL1) und in der Penicillin-Phase (PEN) bei 100% Reizintensität (10 mA).

Oben: in der Penicillin-Phase epileptiforme Nachentladungen in CA1 und CA3

Unten: in der Penicillin-Phase epileptiforme Nachentladungen in CA3

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert

Die Darstellung der Fluoreszenzsignale als Spannungs-Zeit-Kurve zeugte in der CA3-Region in drei von vier Versuchen von einer epilepsietypischen, plateauartigen Verbreiterung der Amplitudenspitze und einer verzögerten Rückkehr zur Grundlinie nach fokaler Penicillin-Anwendung in CA3 (n=3; Abb. 25)*. Einmalig bewirkte die lokale Penicillin-Applikation in der CA3-Region eine deutliche Verkleinerung der in der CA3-Region reizausgelösten Fluoreszenzsignale (n=1). Auch anhand der Fluoreszenz-Kurven wurde sichtbar, dass die Erregung der Nervenzellen in CA3 und CA1 nicht immer identisch erschien. Meistens löste die lokale Penicillin-Anwendung in der CA3-Region in CA1 eine plateauartige Verbreiterung der Amplitudenspitzen aus (n=4; Abb. 25).

*In einem der fünf Versuche war eine zuverlässige Beurteilung der Fluoreszenzkurven aufgrund technisch bedingter Artefakte nicht möglich, daher hier die Gesamtzahl von vier Versuchen

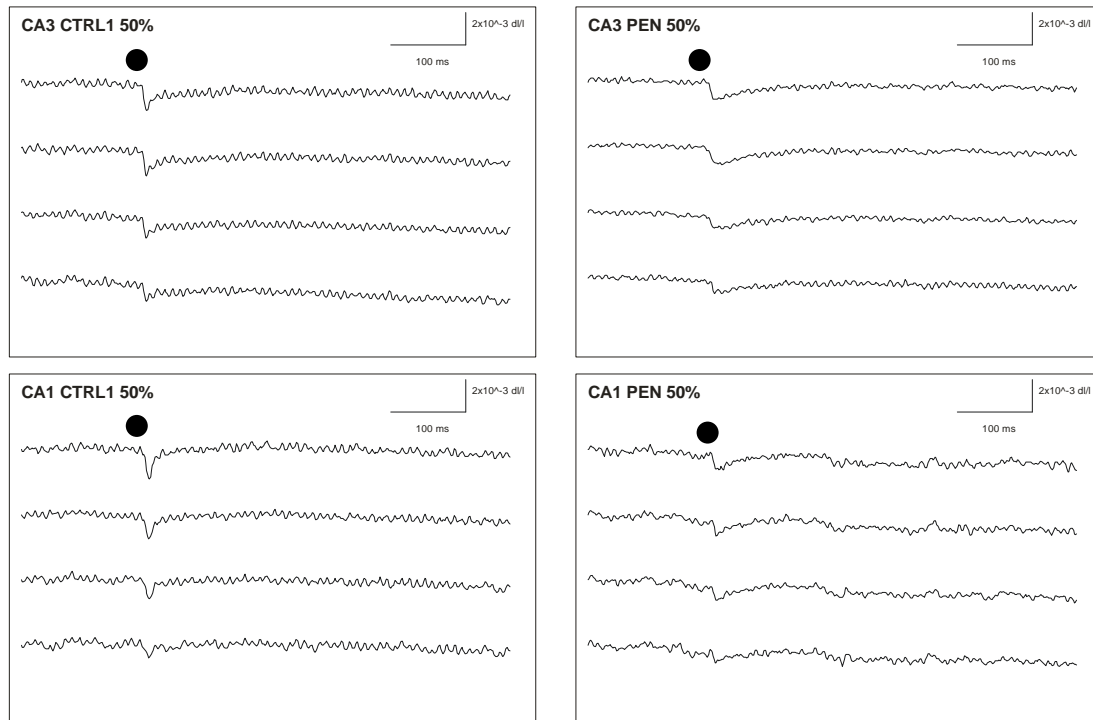


Abb. 25: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA3 (oben) und CA1 (unten) in der Kontrollphase-1 (links) und in der Penicillin-Phase (rechts) bei 50% Reizintensität (5 mA).

Plateauartige Verbreiterung der Amplitudenspitze während der Penicillin-Phase in CA3 deutlicher ausgeprägt als in CA1.

Die Amplitude der Fluoreszenzsignale wird als Fluoreszenzabnahme in Relation zur Restlichtintensität gewertet.

Von oben nach unten je eine Kurve exemplarisch für die Schichten Stratum lacunosum moleculare, Stratum radiatum, Stratum pyramidale, Stratum oriens des Hippocampus.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert

Beim Auswaschen der Penicillin-Lösung aus dem Hirnschnitt während der **dritten Versuchsphase** (Kontrollphase-2; CTRL2) wurde bei der Registrierung der Feldpotentiale deutlich, dass ein durch Penicillin hervorgerufener Effekt auf die Neuronen größtenteils reversibel war ($n=4$). Durch Penicillin ausgelöste Nachentladungen reduzierten sich oder sistierten und die gemessenen Potentialamplitudenwerte glichen denen aus der Kontrollphase-1. In einem Fall kam es allerdings nach Entfernen der Penicillin-Kapillare zu einer abermals verstärkten neuronalen Erregung in CA3 ($n=1$).

Im Gegensatz dazu, waren die Fluoreszenzsignale in der Kontrollphase-2 im Vergleich zur Penicillin-Phase in zwei von vier auswertbaren Versuchen unverändert ($n=2$). In den beiden anderen Versuchen war nach Entfernen der

Penicillin-Kapillare aus der CA3-Region entweder nur noch in der CA1-Region (n=1) oder nur in der CA3-Region (n=1) eine Reizantwort messbar.

In der **vierten Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Phase; 0-Mg), in der die Erregbarkeit des Hirngewebes durch eine magnesiumfreie Badlösung erhöht war, wurde in vier der fünf Versuche aus der Versuchsreihe 1 eine elektrische Reizung vorgenommen. Eine epileptiforme neuronale Aktivität in CA1 und CA3 war anhand der Feldpotentialamplituden und der Entladungsdauer in der Hälfte der Versuche deutlich sichtbar (n=2; Abb. 26). In den restlichen Versuchen war eine reizausgelöste Nervenzellantwort zwar vorhanden, diese war jedoch nicht stärker ausgeprägt als während der Kontrollphase-2 (n=2).

Hinsichtlich der Fluoreszenzsignale war eine typische epileptiforme Erregung in der CA1- und CA3-Region nur einmalig deutlich sichtbar (n=1; Abb. 27).

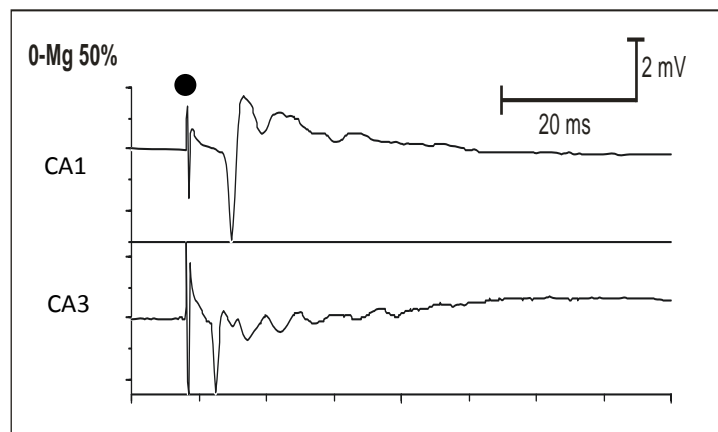


Abb. 26: Originalregistrierung der evozierten Feldpotentiale in der Magnesiumfreien-Phase (0-Mg) bei 50% Reizintensität (5 mA).

In CA1 und CA3 epileptiforme Feldpotentiale sichtbar.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert

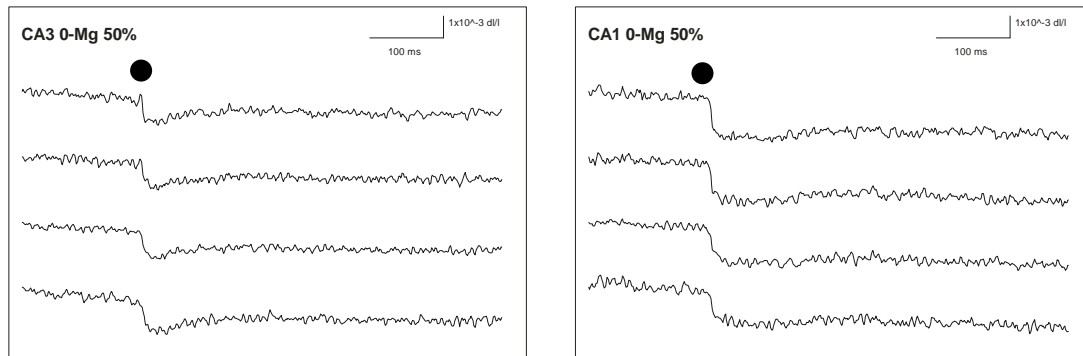


Abb. 27: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA3 (links) und CA1 (rechts) in der Magnesiumfreien-Phase bei 50% Reizintensität (5 mA).

In CA1 und CA3 plateauartige Verbreiterung der Amplitudenspitze und stark verzögerte Rückkehr zur Grundlinie sichtbar.

Die Amplitude der Fluoreszenzsignale wird als Fluoreszenzabnahme in Relation zur Restlichtintensität gewertet.

Von oben nach unten je eine Kurve exemplarisch für die Schichten Stratum lacunosum moleculare, Stratum radiatum, Stratum pyramidale, Stratum oriens des Hippocampus.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert

In der **letzten Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Penicillin-Phase; 0-Mg+PEN) führte eine zusätzliche fokale Penicillin-Applikation in der CA3-Region bei gesteigerter Erregbarkeit des Hirngewebes in zwei von vier Fällen zu einer deutlichen Verstärkung der evozierten Feldpotentiale in CA1 und CA3 (n=2). In einem dieser Versuche ergab auch die Auswertung der Fluoreszenzsignale eine gesteigerte Reizantwort in beiden Regionen (n=1). In den anderen beiden Fällen waren die Feldpotentiale jeweils nur in der CA1-Region (n=1) oder nur in der CA3-Region vergrößert (n=1). In der CA3-Region waren nach der fokalen Penicillin-Applikation in CA3 kaum noch messbare Reizantworten als Fluoreszenzsignale registrierbar (n=3). Für die CA1-Region wurden in dieser Versuchsphase teils keine Fluoreszenzkurven angefertigt (n=3) oder die Messungen waren aufgrund technisch bedingter Artefakte nicht auswertbar (n=1).

2.2. Versuchsreihe 2: Penicillin-Anwendung in CA1 (n=4)

Auch in der zweiten Versuchsreihe wurde während der **ersten Versuchsphase** (Kontrollphase-1; CTRL1) die Aktivität der Nervenzellen bei elektrischer Reizung mit verschiedenen Reizintensitäten (100%, 50%, 10%) erfasst, bevor die Penicillin-Kapillare in der CA1-Region platziert wurde. Die in der CA3-Region vorgenommene Registrierung der evozierten Feldpotentiale war aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Reizelektrode und Ableitelektrode nur in zwei Versuchen bei einer Reizstärke von 10% auswertbar, da es ansonsten zu einer Überlagerung von neuronaler Antwort und Reizartefakt kam.

Während der **zweiten Versuchsphase** (Penicillin-Phase; PEN) fiel bei Betrachtung der Feldpotentiale im Gegensatz zur Versuchsreihe 1 auf, dass eine fokale Penicillin-Applikation in CA1 dort nicht zum Entstehen epileptiformer Nachentladungen führte. Einmalig erschienen die Potentialamplituden in der CA1-Region durch Penicillin-Einfluss geringgradig vergrößert (n=1). In allen anderen Fällen, war nach Aufsetzen der Penicillin-Glaskapillare in der CA1-Region annähernd keine Reizantwort mehr messbar (n=3; Abb. 28). Eine Beurteilung der Auswirkung der lokalen Penicillin-Anwendung in CA1 auf die in CA3 registrierte Reizantwort konnte nur in zwei von vier Versuchen (jeweils ausschließlich bei 10% Reizstärke) vorgenommen werden. In diesen Fällen waren die registrierten Neuronenaktivitäten in CA1 unverändert (n=1) oder leicht verringert (n=1).

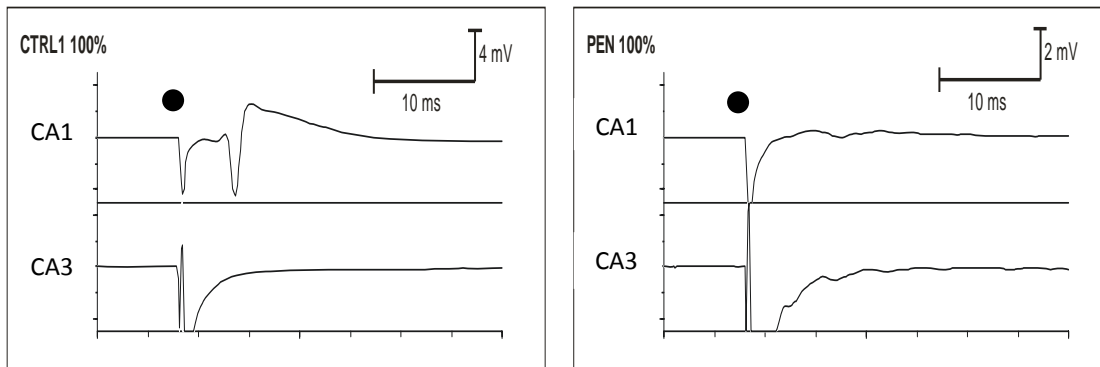


Abb. 28: Originalregistrierung der evozierten Feldpotentiale in der Kontrollphase-1 (links) und in der Penicillin-Phase (rechts) bei 100% Reizintensität (10 mA).

Fast vollständiges Verschwinden der Reizantwort in CA1 nach Penicillin-Applikation sichtbar.

Reizantwort in CA3 nicht auswertbar aufgrund einer Verschmelzung von Reizartefakt und Reizantwort.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert

Hinsichtlich der Fluoreszenzsignale führte eine fokale Penicillin-Applikation in der CA1-Region in drei von insgesamt vier Versuchen bei mindestens zwei von drei Reizintensitäten zu einer Verminderung oder zum Sistieren der neuronalen Reizantwort in CA1 (n=3). Allerdings kam es im Einzelfall zu einer in der Fluoreszenzskurve sichtbaren zweiten Entladung in CA1 (n=1; Abb. 29). Eine typische, für epileptische Aktivität sprechende plateauartige Verbreiterung der Amplitudenspitze in CA1 konnte in einem einzigen Versuch bei einer Reizung (50%) festgestellt werden (n=1; Abb. 29).

Eine Penicillin-Applikation in der CA1-Region löste im Bezug auf die in der CA3-Region registrierten Fluoreszenzsignale meistens eine deutliche Verminderung der Reizantwort aus (n=3). In einem einzigen Versuch zeigte sich während der Penicillin-Phase eine epileptiforme Verbreiterung der Amplitudenspitze in der CA3-Region im Vergleich zur Kontrollphase-1 (n=1).

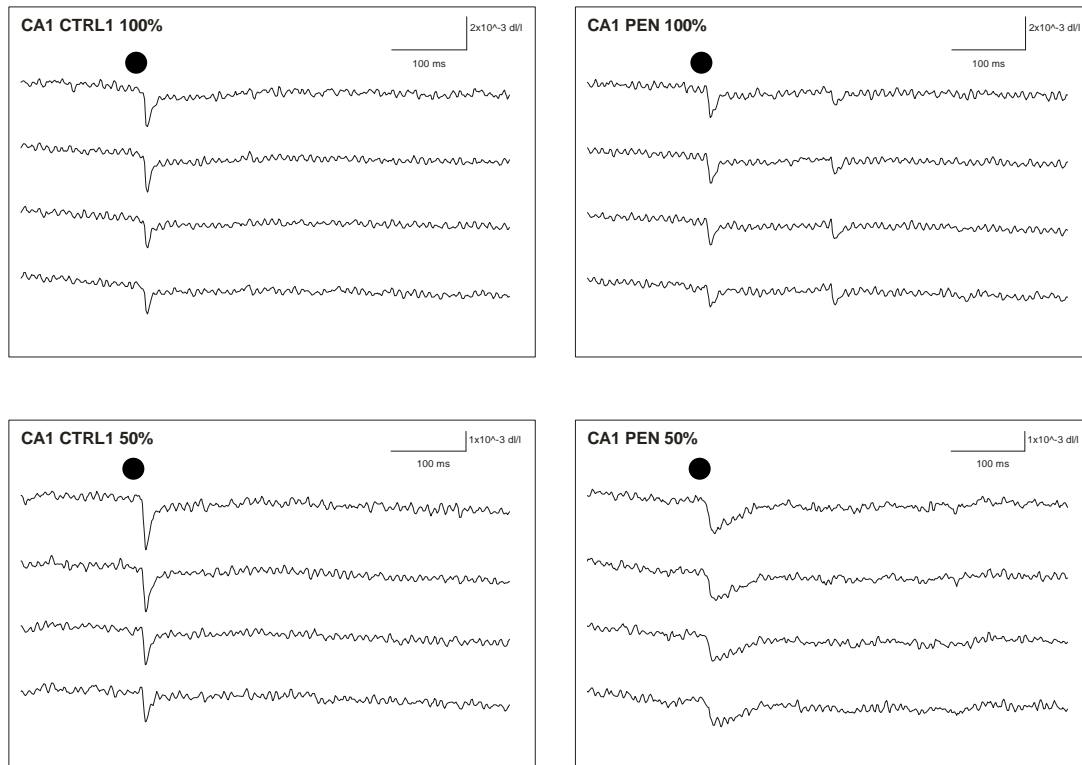


Abb. 29: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA1 in der Kontrollphase-1 (links) und in der Penicillin-Phase (rechts) bei 100% (oben) und 50% (unten) Reizintensität.

Oben rechts: zweite Entladung in CA1 während der Penicillin-Phase sichtbar

Unten rechts: während der Penicillin-Phase sind in CA1 eine plateauartige Verbreiterung der Amplitudenspitze und eine zeitlich verzögerte Rückkehr sichtbar.

Die Amplitude der Fluoreszenzsignale wird als Fluoreszenzabnahme in Relation zur Restlichtintensität gewertet.

Von oben nach unten je eine Kurve exemplarisch für die Schichten Stratum lacunosum moleculare, Stratum radiatum, Stratum pyramidale, Stratum oriens des Hippocampus.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert

Im Verlauf der **dritten Versuchsphase** (Kontrollphase-2; CTRL2) wurde beim Auswaschen der Penicillin-Lösung aus dem Hirngewebe deutlich, dass sowohl die Feldpotentiale als auch die Fluoreszenzsignale in der Penicillin-Phase und in der Kontrollphase-2 überwiegend sehr ähnlich waren. Ein durch die Penicillin-Anwendung in CA1 bedingter Effekt war also, anders als in der Versuchsreihe 1, hier nicht reversibel.

In der **vierten Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Phase; 0-Mg), in der die Hirnschnitte zur Erregungssteigerung mit magnesiumfreier Badlösung umspült wurden, war in den Feldpotentialen nur in einem von vier Versuchen eine deutliche reizausgelöste neuronale Antwort in der CA1- und CA3-Region sichtbar (n=1). Diese durch Reizung evozierte Neuronenaktivität spiegelte sich auch in den Fluoreszenzsignalen wieder, in denen eine deutliche, lang anhaltende Reizantwort sichtbar war. In den restlichen Versuchen waren bei der Ableitung der Feldpotentiale teils minimale, nicht messbare Schwankungen der Grundlinie oder keine Reizantwort sichtbar (n=3). Analog dazu zeigte sich in den gleichen Versuchen in den Fluoreszenz-Kurven keine deutliche neuronale Erregung (n=3).

In der **fünften Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Penicillin-Phase; 0-Mg+PEN) wurde in dieser Versuchsreihe während des Magnesiumentzuges eine Penicillin-Kapillare in der CA1-Region platziert. Die Auswertung der registrierten Feldpotentiale ergab, dass in der Hälfte der vier Versuche eine zusätzliche Penicillin-Anwendung in CA1 zu einer sichtbaren Steigerung der in der CA1-Region evozierten Nervenzellaktivität führte (n=2). Dabei war teilweise die neuronale Aktivität auch in CA3 erhöht (n=1). Es kam auch vor, dass in der letzten Phase in keiner der beiden Hippocampus-Regionen eine neuronale Antwort durch elektrische Reizung auslösbar war, auch wenn davor eine minimale Antwort vorhanden gewesen war (n=1). Im Einzelfall konnte in den Fluoreszenzsignalen eine durch Penicillin-Applikation in der CA1-Region bedingte, auf die CA1-Region begrenzte starke neuronale Erregung mit deutlicher Verbreiterung der Amplitudenspitze registriert werden (n=1; Abb. 30). In den anderen Fällen führte die Penicillin-Anwendung zu keiner Veränderung der Fluoreszenzsignale im Vergleich zur vorherigen Versuchsphase (n=2) oder zu einer minimal verstärkten Reizantwort in CA1 und CA3 (n=1).

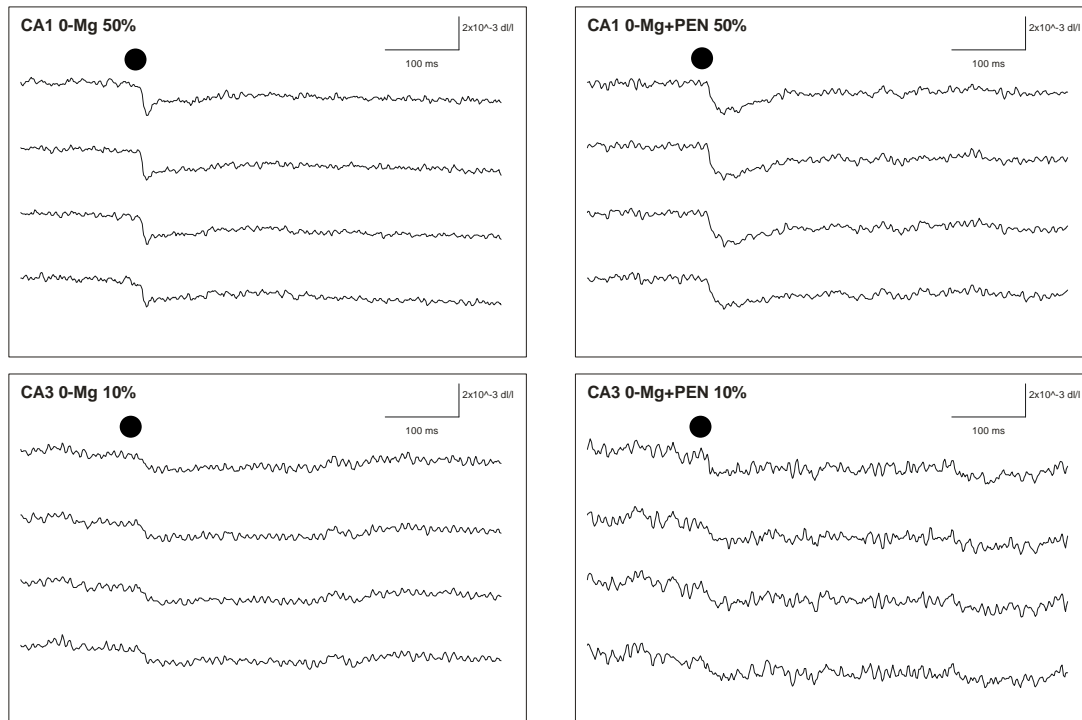


Abb. 30: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA1 (oben) und CA3 (unten) in der Magnesiumfreien-Phase (links) und in der Magnesiumfreien-Penicillin-Phase (rechts) bei 50% (oben) und 10% (unten) Reizintensität.

Deutliche Verbreiterung der Amplitudenspitze in CA1 während der Magnesiumfreien-Penicillin-Phase in CA1 (oben rechts) viel stärker ausgeprägt als in CA3 (unten rechts).

Die Amplitude der Fluoreszenzsignale wird als Fluoreszenzabnahme in Relation zur Restlichtintensität gewertet.

Von oben nach unten je eine Kurve exemplarisch für die Schichten Stratum lacunosum moleculare, Stratum radiatum, Stratum pyramidale, Stratum oriens des Hippocampus.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert

3. Penicillin-induzierte Wirkung auf die räumlich-zeitliche Synchronisierung der Nervenzellen im Hippocampus

Die durch elektrische Reizung ausgelöste Erregung in den Neuronenverbänden der CA1- und CA3-Region des Hippocampus wurde bildlich als Farbcodierung wiedergegeben. Eine zunehmende neuronale Erregung zeigte sich als Farbumschwung von blau (Hyperpolarisation) über grün und gelb zu rot (Depolarisation). Die hexagonale Darstellung spiegelt das aus 464 Photodioden bestehende Array wieder, mit dessen Hilfe der Polarisationszustand der Nervenzellen registriert wurde, die genau in dem Bereich lagen, in dem das Array platziert wurde. Die Anzahl der dargestellten Hexagone wurde jeweils so gewählt, dass die gesamte Zeitspanne von der beginnenden Erregung bis zur Rückkehr der Nervenzellen in den Ruhezustand wiedergegeben wurde (in Einzelfällen war es aus technischen Gründen nicht möglich, die gesamte Erregungsdauer darzustellen). Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen lag jeweils bei 5 Millisekunden.

3.1. Versuchsreihe 1: Penicillin-Anwendung in CA3 (n=5)

In der **ersten Versuchsphase** (Kontrollphase-1; CTRL1) wurde die physiologische Variation der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung im Nervenzellverband bei unterschiedlichen Reizintensitäten (100%, 50%, 10%) erfasst. Dabei fiel auf, dass eine Verminderung der Reizintensität nicht unbedingt mit einer Verminderung der Anzahl depolarisierter Neurone und der zeitlichen Ausdehnung der Depolarisation verbunden war. So kam es vor, dass die neuronale Aktivität im Nervenzellverband bei einer Reizintensität von 10% ausgeprägter erschien als bei einer Reizstärke von 50% oder 100% (Abb. 31).

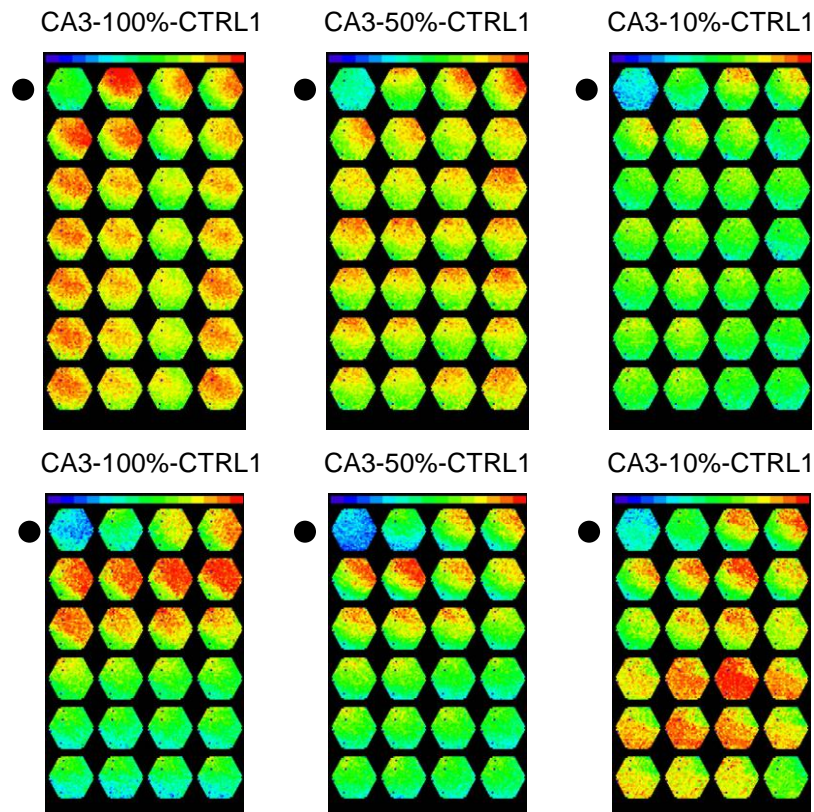


Abb. 31: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA3 in der Kontrollphase-1 (CTRL1) bei den Reizintensitäten 100% (links), 50% (mittig) und 10% (rechts).

Oben: graduelle Verminderung der Erregung mit abnehmender Reizstärke sichtbar.

Unten: Erregung bei 10% Reizstärke länger anhaltend als bei 100% und 50% Reizstärke.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert.

Zeitliche Folge: von links nach rechts und von oben nach unten

Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen: 5 ms

Während der **zweiten Versuchsphase** (Penicillin-Phase; PEN) führte die Reizauslösung bei positionierter Penicillin-Kapillare in der CA3-Region öfter zu einer Abnahme der Anzahl depolarisierter Neurone sowie der zeitlichen Ausprägung der Depolarisation ($n=3$) als zu einer Zunahme dergleichen ($n=2$; Abb. 32).

In der CA1-Region war die Neuronenaktivität während der Penicillin-Anwendung in CA3 in allen Versuchen bei mindestens zwei von drei Reizstärken stärker ausgeprägt als in der Kontrollphase-1 ($n=5$; Abb. 32).

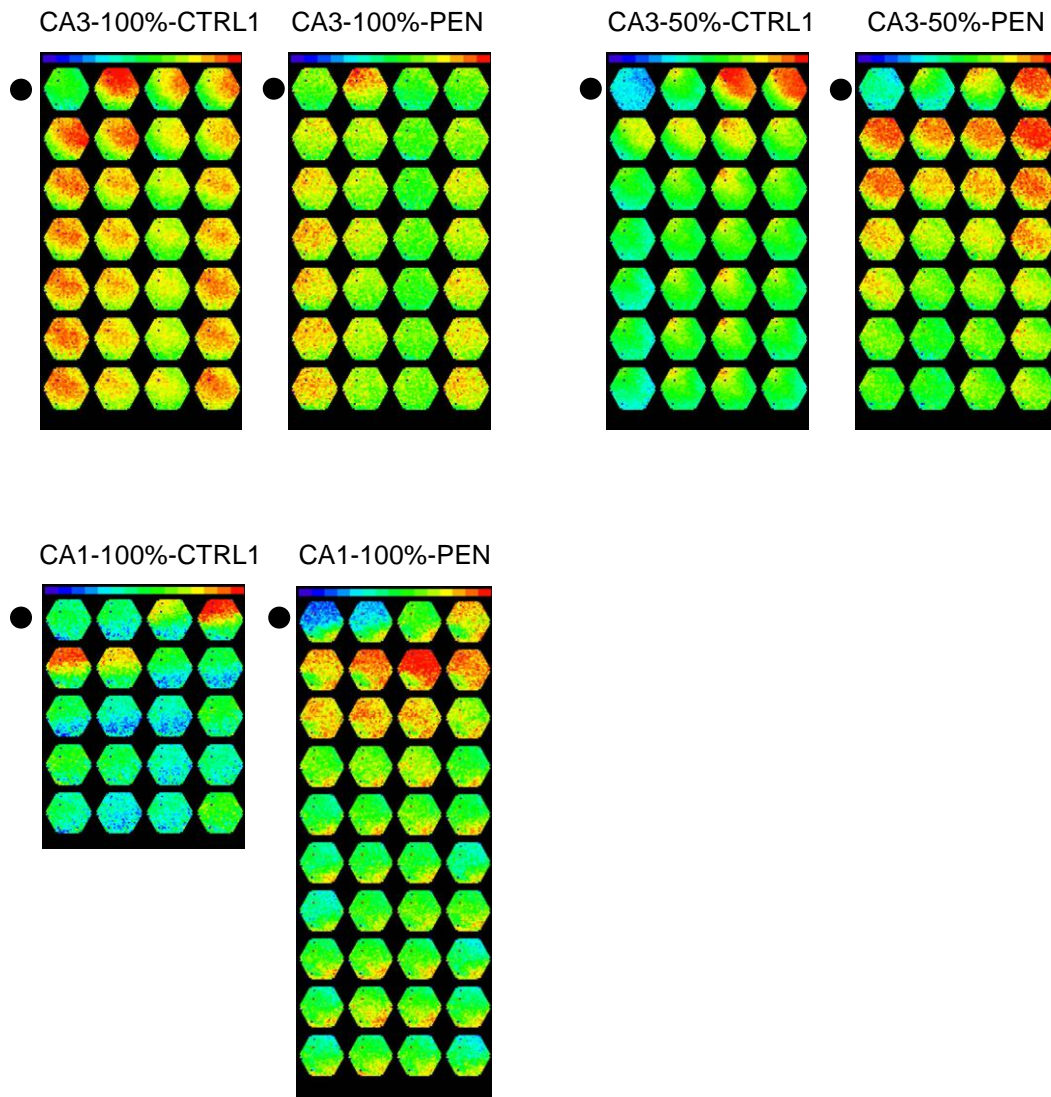


Abb. 32: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA3 (oben) und CA1 (unten) in der Kontrollphase-1 (CTRL1) und in der Penicillin-Phase (PEN) bei 100% und 50% Reizintensität. Oben links: weniger deutlich ausgeprägte Erregung in CA3 nach Penicillin-Zugabe in CA3. Oben rechts: deutlicher ausgeprägte Erregung in CA3 nach Penicillin-Zugabe in CA3. Unten: deutlicher ausgeprägte Erregung in CA1 nach Penicillin-Zugabe in CA3. Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert. Zeitliche Folge: von links nach rechts und von oben nach unten. Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen: 5 ms

In der **dritten Versuchsphase** (Kontrollphase-2; CTRL2) zeigte sich bei der Darstellung der Fluoreszenzsignale als Farbcodierung, dass ein durch Penicillin-Applikation in CA3 induzierter Effekt in CA1 und in CA3 nur in einem Fall vollständig reversibel war ($n=1$). In den übrigen Versuchen war der

Penicillin-bedingte Effekt entweder nur in CA1 reversibel (n=2) oder weder in CA1 noch in CA3 reversibel (n=2).

In der **vierten Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Phase; 0-Mg) konnte anhand der Anzahl depolarisierter Neuronen und der Dauer der Erregung in allen vier Versuchen, in denen eine elektrische Reizung vorgenommen wurde, bei mindestens einer Reizstärke in CA3 eine deutlich gesteigerte Erregbarkeit während des Magnesium-Entzuges registriert werden (n=4). Größtenteils war auch eine gesteigerte Aktivität der CA1-Neuronen sichtbar (n=3; Abb. 33).

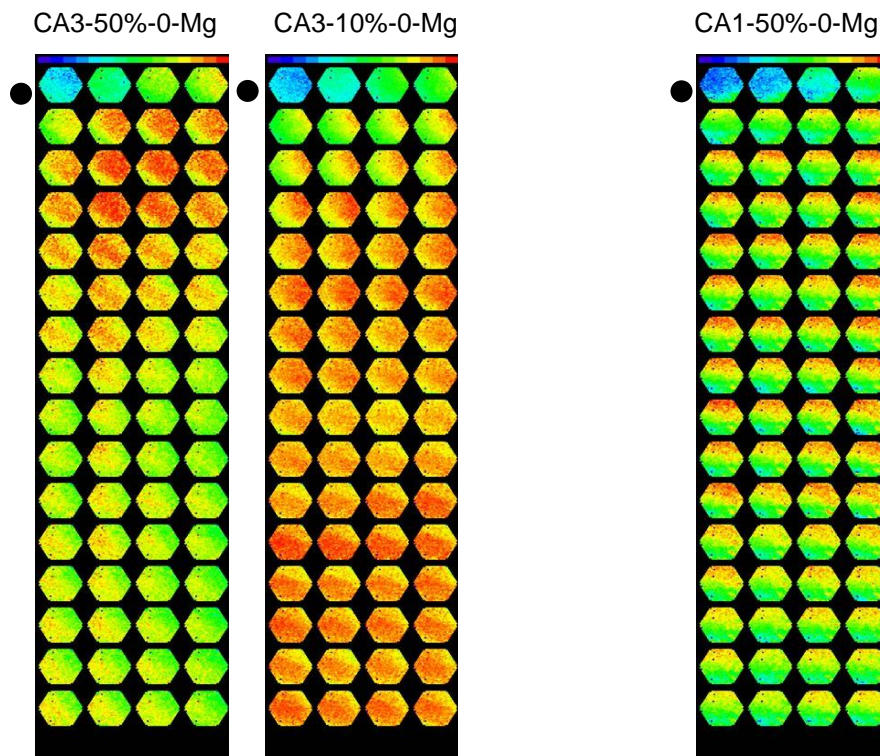


Abb. 33: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA3 (links) und CA1 (rechts) in der Magnesiumfreien-Phase (0-Mg) bei 50% und 10% Reizintensität.

Links: stark ausgeprägte und lang anhaltende Depolarisation in CA3 bei 50% und 10% Reizstärke.

Rechts: Lang anhaltende Depolarisation in CA1 bei 10% Reizstärke.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert. Zeitliche Folge: von links nach rechts und von oben nach unten. Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen: 5 ms

In der **fünften Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Penicillin-Phase; 0-Mg+PEN) bewirkte eine zusätzliche lokale Penicillin-Anwendung in der CA3-Region während des Magnesium-Entzuges bei insgesamt 4 Versuchen entweder keine Veränderung (n=2) oder eine Reduktion der Reizantwort der CA3-Neuronen (n=2; Abb. 34). In der CA1-Region wurde bei den Messungen von insgesamt drei Versuchen in dieser Phase entweder eine vermehrte (n=1), verminderte (n=1) oder gleichbleibende Erregung (n=1) im Vergleich zur vorherigen Versuchsphase registriert (Abb. 35).

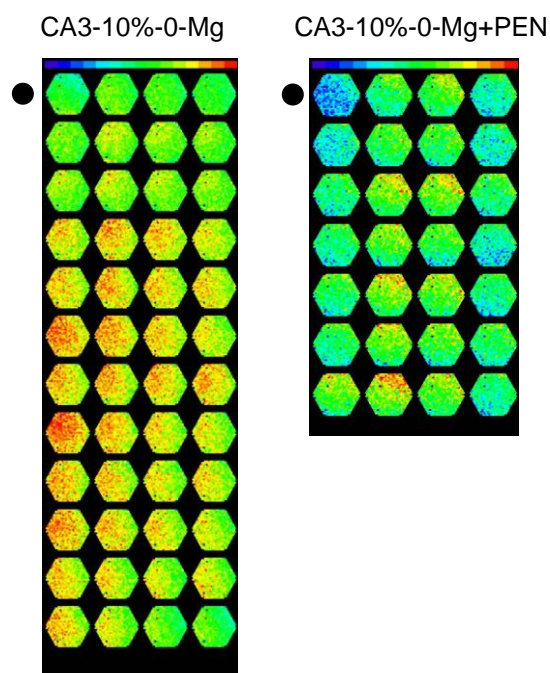


Abb. 34: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA3 in der Magnesiumfreien-Phase (0-Mg) und in der Magnesiumfreien-Penicillin-Phase (0-Mg+PEN) bei 10% Reizintensität.

Unter Penicillin-Zugabe Reduktion der reizausgelösten Neuronenaktivität sichtbar.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert.

Zeitliche Folge: von links nach rechts und von oben nach unten

Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen: 5 ms

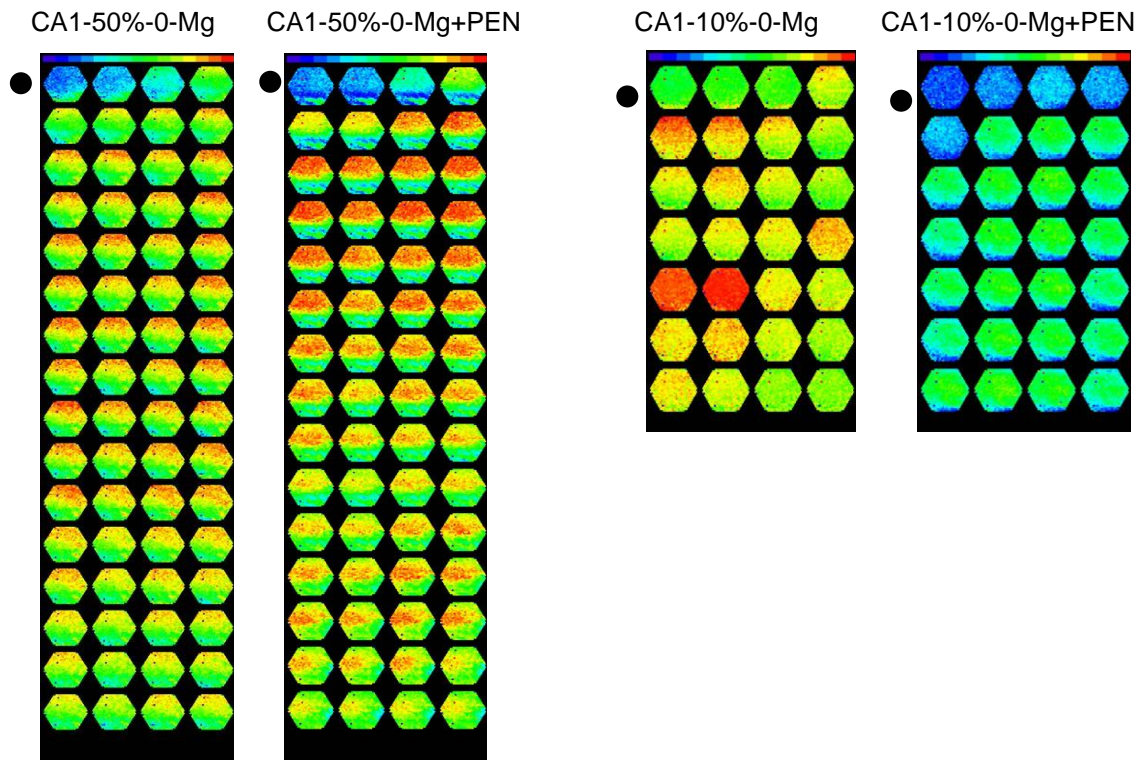


Abb. 35: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA1 in der Magnesiumfreien-Phase (0-Mg) und in der Magnesiumfreien-Penicillin-Phase (0-Mg+PEN) bei 50% (links) und 10% (rechts) Reizintensität.

Links: Steigerung der neuronalen Aktivität in CA1 unter Penicillin-Zugabe in CA3.

Rechts: Reduktion der neuronalen Aktivität in CA1 unter Penicillin-Zugabe in CA3.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert.

Zeitliche Folge: von links nach rechts und von oben nach unten

Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen: 5 ms

3.2. Versuchsreihe 2: Penicillin-Anwendung in CA1 (n=4)

Auch in dieser Versuchsreihe wurde in der **ersten Versuchsphase** (Kontrollphase-1; CTRL1) die Variation der evozierten neuronalen Aktivität bei den Reizintensitäten 100%, 50% und 10% registriert.

In der **zweiten Versuchsphase** (Penicillin-Phase; PEN) führte die lokale Penicillin-Anwendung in der CA1-Region in drei von vier Versuchen bei jeweils einer Reizintensität zu einer deutlich verstärkten Reizantwort im Nervenzellverband der CA1-Region (n=3; Abb. 36), bei den anderen Reizintensitäten war die Reizantwort jeweils vermindert. Es kam allerdings auch in einem Fall vor, dass die neuronale Erregung in CA1 in der Penicillin-Phase unverändert (n=1) war im Vergleich zur Kontrollphase-1 (Abb. 36). In der CA3-Region war währenddessen in drei von vier Versuchen eine verminderte (n=1) oder gleichbleibende (n=2) der Anzahl depolarisierter Neuronen unter dem Penicillin-Einfluss sichtbar (Abb. 37). In dem übrigen Versuch sah man in CA3 eine verstärkte Neuronenaktivität während der Penicillin-Anwendung in CA1 (n=1).

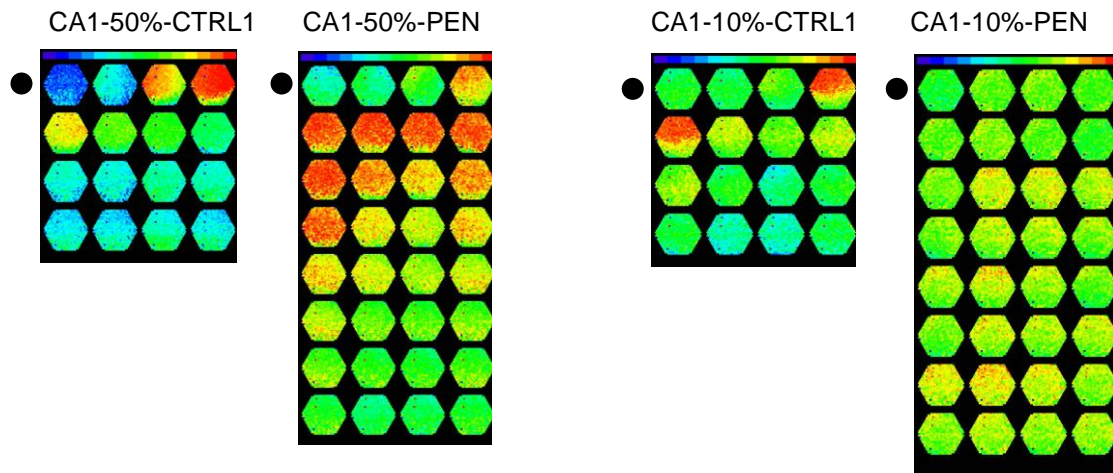


Abb. 36: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA1 in der Kontrollphase-1 (CTRL1) und in der Penicillin-Phase (PEN) bei 50% (links) und 10% (rechts) Reizintensität.

Links: Steigerung der neuronalen Aktivität in CA1 bei Penicillin-Zugabe in CA1 sichtbar.

Rechts: Reduktion der neuronalen Aktivität in CA1 bei Penicillin-Zugabe in CA1 sichtbar.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert.

Zeitliche Folge: von links nach rechts und von oben nach unten

Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen: 5 ms

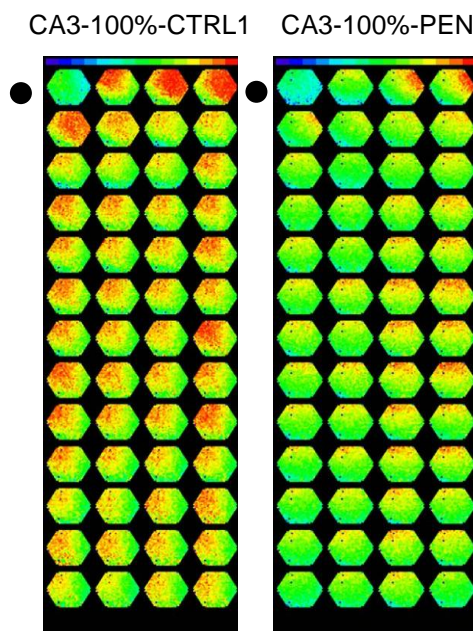


Abb. 37: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA3 in der Kontrollphase-1 (CTRL1) und in der Penicillin-Phase (PEN) bei 100% Reizintensität.

Reduktion der neuronalen Aktivität in CA3 unter Penicillin-Zugabe in CA1 sichtbar.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert.

Zeitliche Folge: von links nach rechts und von oben nach unten

Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen: 5 ms

In der **dritten Versuchsphase** (Kontrollphase-2; CTRL2) zeigte sich in dieser Versuchsreihe, dass ein durch Penicillin-Applikation in CA1 hervorgerufener Effekt nur in einem der vier Versuche in CA1 und CA3 annähernd reversibel war (n=1).

In der **vierten Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Phase; 0-Mg) war bei insgesamt vier Versuchen während des Magnesiumentzuges in manchen Fällen eine deutlich ausgeprägte und lang anhaltende Depolarisation der Nervenzellen der Regionen CA3 (n=1) oder CA1 (n=2) sichtbar (Abb.38).

Nach zusätzlicher fokaler Penicillin-Anwendung in der CA1-Region kam es in der **fünften Versuchsphase** (Magnesiumfreie-Penicillin-Phase; 0-Mg+PEN) in der CA1-Region entweder zu einer Verstärkung (n=1) oder zu einer Verminderung der neuronalen Erregung bei mindestens zwei von drei Reizintensitäten (n=3). In der CA3-Region zeigte sich größtenteils eine verminderte neuronale Aktivität im Vergleich zur Magnesiumfreien-Phase (n=3; Abb. 38), nur einmalig war hier eine verstärkte Reizantwort messbar (n=1).

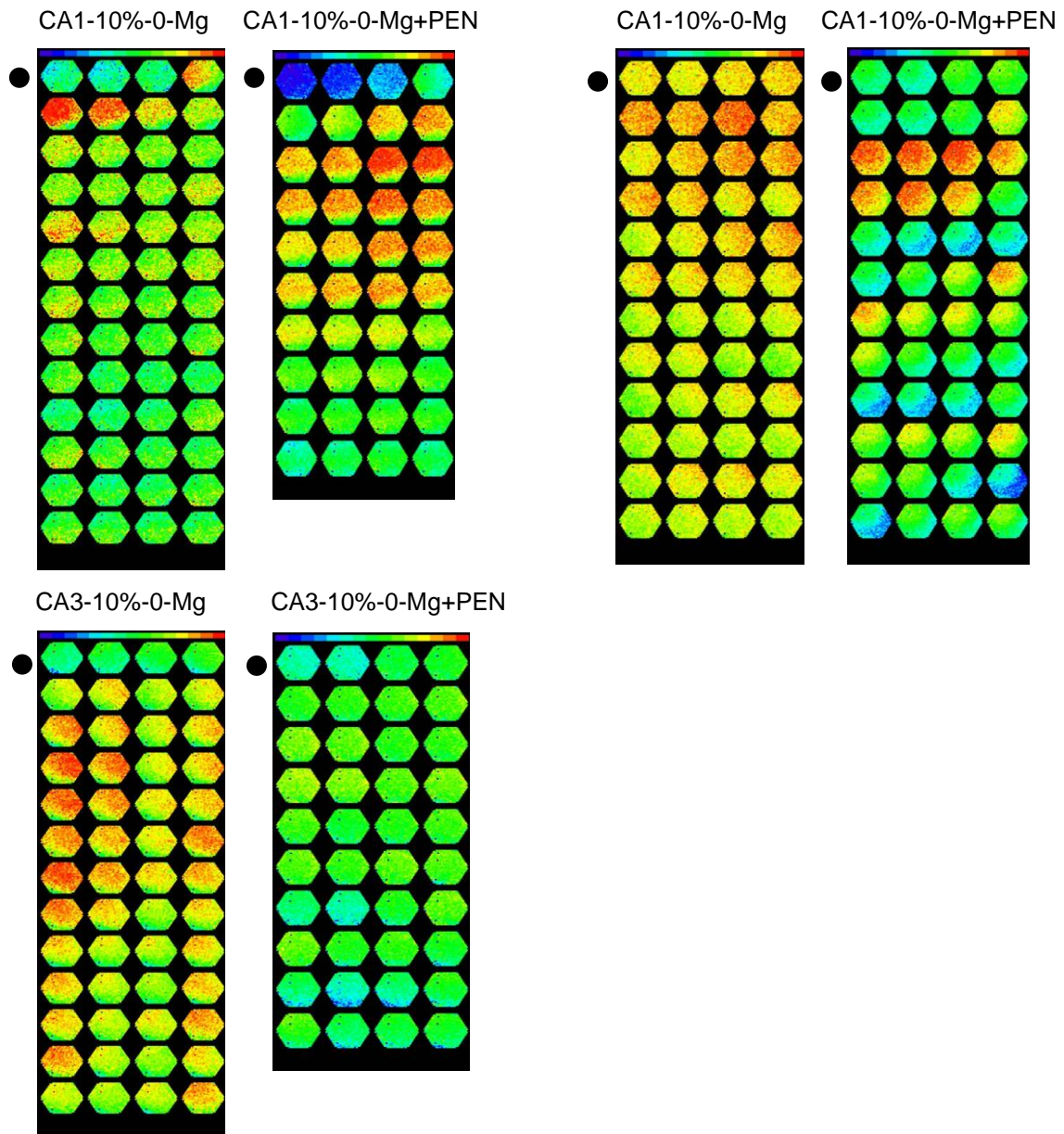


Abb. 38: Originalregistrierung der Fluoreszenzsignale in CA1 (oben) und CA3 (unten) in der Magnesiumfreien-Phase (0-Mg) und in der Magnesiumfreien-Penicillin-Phase (0-Mg+PEN) bei 10% Reizintensität.

Oben links: Steigerung der neuronalen Erregung in CA1 bei Zugabe von Penicillin in CA1.

Oben rechts: Reduktion der neuronalen Aktivität in CA1 bei Zugabe von Penicillin in CA1

Unten: Reduktion der neuronalen Aktivität in CA3 bei Zugabe von Penicillin in CA1.

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert; Zeitliche Folge: von links nach rechts und von oben nach unten; Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Hexagonen: 5 ms

4. Vergleich der Feldpotentiale und der Fluoreszenzsignale

Beim Vergleich der mit zwei unterschiedlichen Methoden registrierten Neuronenaktivität fiel mehrfach auf, dass es innerhalb der gleichen Messung zu Diskrepanzen zwischen den Feldpotentialen und Fluoreszenzsignalen kam. So konnten sehr ähnlich aussehende evozierte Feldpotentiale mit einem unterschiedlichen Ausmaß der neuronalen Depolarisation in den Fluoreszenzsignalen einhergehen (Abb. 39).

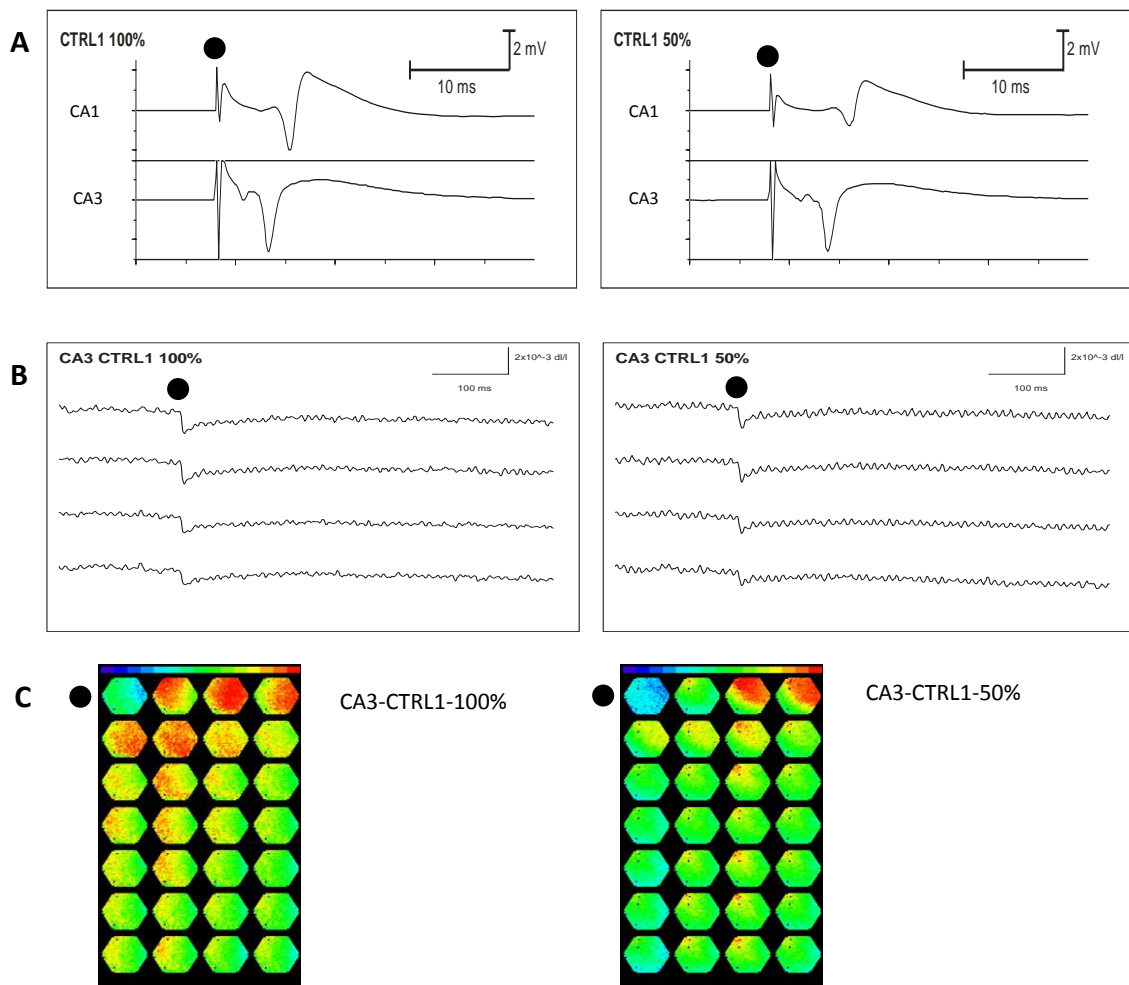


Abb. 39: Vergleich der evozierten Aktivität innerhalb eines Versuchs in der Kontrollphase-1 bei den Reizstärken 100% (links) und 50% (rechts).

A: sehr ähnlich aussehende Feldpotentiale in CA3

B: sehr ähnlich aussehende Fluoreszenzkurven

C: unterschiedliches Ausmaß der neuronalen Depolarisation in der Darstellung als

Farbcodierung

Reizauslösung durch schwarzen Punkt markiert

Weiterhin fiel auf, dass bei epileptischen Entladungen nicht unbedingt alle Neuronen einer Region gleichzeitig depolarisiert waren (Abb. 40).

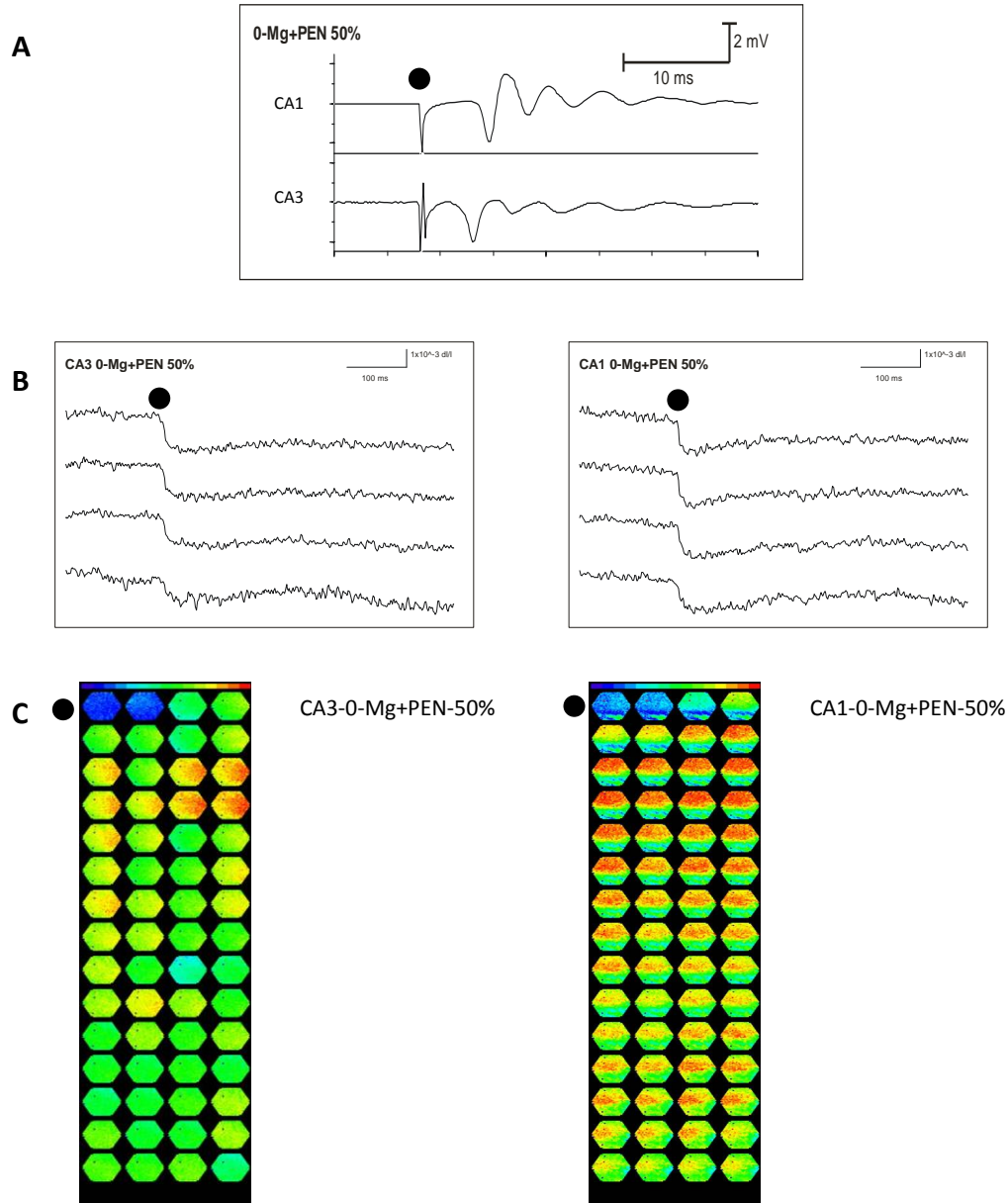


Abb. 40: Darstellung der epileptiformen Aktivität innerhalb eines Versuchs in der Magnesiumfreien-Penicillin-Phase bei 50% Reizintensität.

A: Feldpotentiale in CA1 und CA3 mit deutlichen Nachentladungen

B: Fluoreszenzkurven mit deutlicher Verbreiterung der Amplitudenspitze

C: unterschiedliches Ausmaß der neuronalen Depolarisation bei epileptischer Aktivität
Reiauslösung durch schwarzen Punkt markiert

V. DISKUSSION

1. Zielsetzung

Die Epilepsie bezeichnet eine Störung des Gehirns, die durch wiederkehrende Unterbrechungen der regelrechten zerebralen Funktion gekennzeichnet ist und mit einer dauerhaften Neigung zur Entwicklung epileptischer Anfälle einhergeht (Fisher et al., 2005). Auf zellulärer Ebene führt eine Störung des Gleichgewichts zwischen neuronaler Exzitation und Inhibition zu hypersynchroner Aktivität der Neurone. Obschon die Epileptologie eine Wissenschaft ist, die einem permanenten und beachtlichen Fortschritt unterliegt, konnte der Zusammenhang aller Prozesse der Iktogenese am Hippocampus bisher nicht abschließend geklärt werden. Daher scheint es sinnvoll, eine Evaluierung der Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität in gesundem Hirngewebe vorzunehmen.

Ziel dieser Untersuchungen war es, an vitalen und gesunden Hippocampus-Schnitten der Ratte eine durch Penicillin vermittelte lokale Aufhebung der GABA_A-vermittelten Inhibition zu induzieren und somit begrenzte epileptische Herde in der CA1- und in der CA3-Region zu erzeugen. Für dieses Vorhaben wurde ein Versuchsmodell zur gezielten und räumlich definierten Anwendung von Wirkstoffen am Hirnschnitt entwickelt (siehe III.6). Zur Überprüfung der Machbarkeit dieser Untersuchungen wurde die Methode bei insgesamt 11 coronalen Hippocampus-Schnitten eingesetzt (9 Versuche mit Penicillin-Lösung und 2 Kontrollversuche mit *artificial cerebrospinal fluid*). Die Auswertung der experimentell gewonnenen Daten erfolgte rein deskriptiv ohne statistischen Vergleich. Mit Hilfe der etablierten Methode konnten in den Versuchen zufriedenstellende Ergebnisse erreicht werden, so dass die Anforderungen an das Projektziel erfüllt wurden. Im Hinblick auf die Durchführung weiterführender Untersuchungen mit höheren Versuchszahlen liefern die ermittelten Messwerte Hinweise für die Berechnung statistisch relevanter Parameter (Varianz). Ein

detaillierter Einblick in die Aktivitätsmuster der Nervenzellen dieser Hippocampus-Subregionen vor, während und nach der Anwendung Epilepsie induzierender Maßnahmen wurde durch die gleichzeitige Ableitung von Feldpotentialen und die Registrierung der Membranpotentialänderungen mit Hilfe spannungssensitiver Farbstoffe sichergestellt. Im Sinne einer Pilotstudie liefern die experimentell gewonnenen Daten erste Hinweise auf regionale Unterschiede der Wirkung einer lokalen Penicillin-Anwendung in diesen beiden Hippocampus-Subregionen. Weiterhin ermöglichte die Durchführung dieser Untersuchungen die Darstellung einer überregionalen Interaktion der CA1- und CA3-Neuronennetze.

2. Evaluation der Ergebnisse

Anhand der vorliegenden Untersuchungen konnte die Hyperexzitabilität des gesunden Hippocampus-Gewebes und im Besonderen der CA3-Subregion demonstriert werden. Bei der kontinuierlichen Registrierung der Spontanaktivität wurde mehrfach eine erhöhte intrinsische Grundaktivität vor allem der CA3-, vereinzelt aber auch der CA1-Zellpopulation beobachtet. In einer früheren Studie beschrieben auch Wong, Schwartzkroin, Courtney und Prince 1978 das Vorhandensein verstärkter Grundaktivität in der CA3-Region von Hippocampus-Schnitten des Meerschweinchens ohne die Anwendung Epilepsie induzierender Maßnahmen (unpublished observations, aus Schwartzkroin and Prince, 1978). Dies spricht für die besondere Bereitschaft der CA3-Subregion, epileptische Aktivität zu generieren und erklärt die häufige Beteiligung des Hippocampus bei Epilepsien.

Die fokale Penicillin-Anwendung zur Auslösung räumlich begrenzter epileptischer Herde verdeutlichte, dass sich eine durch lokale Hemmung der GABA_A-vermittelten Inhibition hervorgerufene neuronale Reaktion in der CA3-Region anders verhält als in der CA1-Region.

Sowohl im Hinblick auf die Spontanaktivität als auch auf die reizausgelöste Aktivität der Nervenzellen, ermöglichte die Applikation einer Penicillin-Lösung in der CA3-Region die Erzeugung räumlich begrenzter epileptiformer Entladungen in dieser Hippocampus-Subregion. Aus einer bereits veröffentlichten Studie, in der eine Penicillin-haltige Inkubationslösung die gesamten Hippocampus-Schnitte umspülte, geht eine unausbleibliche orthodrome Weiterleitung der in der CA3-Region generierten epileptiformen Aktivität über die Schaffer-Kollateralen in die CA1-Region hervor (Schwartzkroin and Prince, 1978). In der genannten Studie konnte die Propagation der neuronalen Aktivität von CA3 nach CA1 lediglich bei Durchtrennung der Schaffer-Kollateralen unterbunden werden. Im Gegensatz zu den beschriebenen Ergebnissen konnte eine zwangsläufige orthodrome Weiterleitung der epileptiformen Entladungen von CA3 nach CA1 in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden. Eine fehlende orthodrome Weiterleitung der bioelektrischen Aktivität von der CA3-Region in die CA1-Region durch eine präparationsbedingte Schädigung der Schaffer-Kollateralen konnte sicher ausgeschlossen werden. Möglicherweise bedingt die Aktivierung der zahlreich vorliegenden rekurrenten, exzitatorischen Synapsen zwischen den CA3-Prinzipalzellen (Le Duigou et al., 2013) eine durch Penicillin ausgelöste, vor allem lokal gesteigerte neuronale Aktivität in dieser Region.

Demgegenüber kam es bei der lokalen Penicillin-Anwendung in der CA1-Region in den meisten Fällen nicht zu einer räumlich auf diese Hippocampus-Subregion begrenzten Wirkung. Sowohl in der CA1-Region als auch in der CA3-Region konnte meist eine Veränderung der neuronalen Aktivität registriert werden. Eine Diffusion der Penicillin-Lösung zwischen den einzelnen Hippocampus-Subregionen erscheint unwahrscheinlich, muss aber als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden. Vielmehr scheint es

naheliegender, dass die allgemein bekannte unidirektionale trisynaptische Erregungsleitung (Schultz and Rolls, 1999) nicht die einzige Form der Informationsprozessierung im Hippocampus darstellt. Es ist bereits bekannt, dass zwischen der CA3-Subregion und dem Gyrus Dentatus exzitatorische rückläufige Verbindungen bestehen (Scharfman, 2007). Bei experimenteller Reduktion der GABA-vermittelten Inhibition kann eine Aktivierung der Körnerzellen durch die CA3-Pyramidenzellen verlässlich reproduziert werden (Scharfman, 2007). Zudem sind neben lokal regulierenden inhibitorischen Interneuronen subregionenübergreifende inhibitorische Feedback-Mechanismen GABA-reaktiver CA1-Interneuronen auf die CA3- und Hilus-Subregionen beschrieben (Sik et al., 1994).

Im Gegenzug zur lokalen Penicillin-Wirkung in der CA3-Region, die sich als überwiegend erregungssteigernd darstellte, bewirkte das Vorhandensein der Penicillin-Lösung in der CA1-Region in den hier durchgeführten Untersuchungen mehrheitlich eine deutliche Verminderung der reizausgelösten neuronalen Antwort der CA1-Pyramidenzellen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von Penicillin in CA1 und CA3 wäre das Vorliegen unterschiedlicher Reizschwellen in diesen beiden Hippocampus-Subregionen. Bei einem Vergleich der konzentrationsabhängigen Wirkung von Penicillin auf die Prinzipalzellen von Gyrus Dentatus und CA3-Region, wurde eine Aktivitätssteigerung der Nervenzellen durch eine steigende Penicillin-Konzentration nur in der CA3-Region beschrieben (Tosaki, Yuasa and Kageyama, 1982). Die Untersucher begründen das Vorliegen unterschiedlicher Reizschwellen in den verschiedenen Regionen durch funktionell differierende Neuronennetzwerke. Weiterhin fehlen in der CA1-Subregion, im Gegensatz zur CA3-Subregion, rekurrente exzitatorische Synapsen zwischen den Pyramidenzellen, wodurch das Entstehen epileptiformer Aktivität unwahrscheinlicher ist (Menendez de la Prida and Pozo, 2002). Andere Autoren gehen davon aus, dass bei der Entstehung epileptischer Entladungen die CA3-Prinzipalzellen als Schrittmacher für die CA1-Zellen agieren (Bernardo et al., 1984). Interessanterweise gelang es Dichter, Herman und Selzer 1973 an

isolierten CA1-Zellpopulationen der Katze fokale epileptische Entladungen durch die topische Anwendung von kristallinem Penicillin hervorzurufen (Dichter et al., 1973). Auch Schwartzkroin und Prince demonstrieren, dass mittels Penicillin epileptische Aktivität an isolierten CA1-Zellpopulationen ausgelöst werden kann (Schwartzkroin and Prince, 1978). Damit steht fest, dass die Erzeugung übermäßiger neuronaler Aktivität grundsätzlich in den einzelnen Hippocampus-Subregionen unabhängig von überregionalen erregenden Signalen möglich ist. Das Zusammenspiel der Neurone unterschiedlicher Hippocampus-Subregionen scheint allerdings einen erheblichen Einfluss auf die Wirkung einer lokalen Blockade der GABA_A-vermittelten Inhibition zu haben. Diese Tatsache impliziert, dass die Informationsverarbeitung im Hippocampus nicht allein durch lokale Regulationsmechanismen kontrolliert wird. Vielmehr scheint ein hochkomplexes Zusammenspiel überregionaler Neuronennetzwerke ausschlaggebend für spezifische, lokale neuronale Aktivitätsmuster zu sein. Gleichzeitig veranschaulicht die Diskrepanz der auf unterschiedliche Weise gewonnenen Information (isolierte CA1-Inseln vs. ganze Hippocampus-Schnitte), die Bedeutsamkeit interagierende Neuronennetzwerke im Gesamten zu betrachten.

Auffallend war im Laufe der Versuche auch, dass eine Verminderung der Reizintensität nicht immer mit einer graduellen Verringerung der reizausgelösten neuronalen Antwort einherging. Die Anzahl depolarisierter Neurone und die zeitliche Ausdehnung der Depolarisation waren unter Umständen bei einer niedrigen Reizstärke ausgeprägter als bei einer hohen Reizintensität. Begründen lässt sich diese Beobachtung dadurch, dass die Verfügbarkeit der Nervenzellen für eine Reizantwort nicht zu jedem Zeitpunkt exakt gleich ist. Die Rekrutierbarkeit und damit die Erregbarkeit der Neurone, also letztendlich auch die Stärke der neuronalen Antwort, sind abhängig vom bestehenden Erregungsniveau im Nervenzellverband (Speckmann, 1986). Sind die neuronalen Elemente bereits durch Erregung besetzt, stehen sie nicht mehr für eine Reizbeantwortung zur Verfügung (Speckmann, 1986). Möglicherweise erklärt dieser Umstand die stark gehemmte Antwort der CA1-Zellpopulation bei

elektrischer Reizung während einer lokalen Penicillin-Anwendung in dieser Subregion. Demnach wären die CA1-Zellen durch die lokale Hemmung der GABA_A-vermittelte Inhibition unterschwellig erregt und stünden nicht mehr für eine Beantwortung des elektrischen Stimulus zur Verfügung.

Ein weiterer subregionaler Unterschied der CA1- und CA3-Zellpopulationen zeigte sich in der Reversibilität eines durch Penicillin hervorgerufenen Effektes. Im Hinblick auf die Erfassung der Feldpotentiale wurde deutlich, dass ein ausgelöster Effekt durch eine Penicillin-Anwendung in der CA3-Region im Gegensatz zu einer Penicillin-Anwendung in der CA1-Region überwiegend reversibel war. Aus anderen Untersuchungen geht hervor, dass ein Auswaschen des Penicillins die normale neuronale Aktivität reproduzierbar wiederherstellt (Schwartzkroin and Prince, 1980; Schneiderman et al., 1994). Bemerkenswert ist in den hier durchgeführten Untersuchungen allerdings, dass sich die Auswaschbarkeit der Penicillin-Lösung in den Fluoreszenzsignalen im Gegensatz zu den Feldpotentialen nicht eindeutig widerspiegelte. In beiden Versuchsreihen war anhand der Fluoreszenzsignale eine über die Penicillin-Phase hinaus anhaltende Wirkung der Penicillin-Lösung auf die neuronale Aktivität sichtbar. Dies verdeutlicht die Möglichkeit, mit Hilfe des optischen Registrierverfahrens lokale Erregungszustände genauer zu erfassen.

Diese Diskrepanz zwischen den mittels zwei unterschiedlichen Registrierverfahren gewonnenen Ergebnissen trat im Laufe dieser Untersuchungen wiederholte Male auf. Unabhängig von der Veränderung der Feldpotentiale konnte die lokale Anwendung von Penicillin in den beiden untersuchten Hippocampus-Subregionen in den Fluoreszenzsignalen mit einer gleichbleibenden, erhöhten oder verminderten Anzahl depolarisierter Neurone einhergehen. Eine anhand der Feldpotentiale festgestellte Aktivitätssteigerung der Nervenzellen ging also nicht unbedingt mit einer sichtbar gesteigerten Anzahl depolarisierter Neurone oder verlängerten Dauer der Depolarisation in den Fluoreszenzsignalen einher. Andererseits war eine in den Fluoreszenzsignalen sichtbar gesteigerte Depolarisation nicht unbedingt mit

vergrößerten Feldpotentialamplituden oder epileptiformen Nachentladungen verbunden. Diese Feststellung deckt sich mit Angaben aus der Literatur, die ähnliche aussehende epileptische Entladungen im lokalen EEG mit einem unterschiedlichen Ausmaß der neuronalen Depolarisation in der Nervenzellpopulation beschreiben (Speckmann, 2008). Ebenso ist bekannt, dass ein ähnliches Ausmaß der neuronalen Depolarisation mit unterschiedlichen epileptischen Entladungen im EEG einhergehen kann (Speckmann, 2008). Sehr wahrscheinlich lässt sich diese Tatsache darauf zurückführen, dass bei der Registrierung der Feldpotentiale und der Erfassung der Fluoreszenzsignale unterschiedliche lokale Begrenzungen vorliegen. Während die Feldpotentiale einen groben Überblick über die gesamte Aktivität im Neuronenverband liefern, beziehen sich die Fluoreszenzsignale tatsächlich nur strikt auf die neuronale Aktivität innerhalb des hexagonalen Diodenarrays. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Herkunft der registrierten Signale bei beiden Methoden nicht die gleiche ist, obwohl beide Auskunft über die Populationsaktivität geben. Während Feldpotentiale extrazellulär ableitbare Potentialdifferenzen darstellen, geben die Fluoreszenzsignale die Spannungsveränderungen über die Zellmembranen wieder.

Das optische Registrierverfahren mit Hilfe spannungssensitiver Farbstoffe erweist sich dementsprechend als überaus wertvolle Methode zur Erfassung der Aktivität definierter Zellpopulationen, da es eine exakte Bewertung einzelner Neuronengruppen innerhalb einer bestimmten Hirnregion ermöglicht.

Die Erfassung der Membranpotentialänderungen mit Hilfe eines spannungssensitiven Farbstoffes ermöglichte Weiterhin die Bewertung der neuronalen Synchronisierungsprozesse in räumlich definierten Bereichen. Die übermäßige Synchronisierung der Aktivität innerhalb einer Neuronenpopulation wird oftmals im Zusammenhang mit der Entstehung epileptischer Aktivität genannt (Bernardo et al., 1984). Definitionsgemäß beschreibt die Synchronisierung das zeitliche Aufeinander-Abstimmen bestimmter Vorgänge. Sie stellt eine Form der Interaktion dar (Schindler, 2012). Insofern repräsentieren die Feldpotentiale, als Ausmaß der zeitlich aufeinander

abgestimmten Spannungsveränderungen, die zeitlich synchronisierte Nervenzellaktivität im Neuronenverband.

Das optische Registrierverfahren erlaubt die Einschätzung der räumlichen Verteilung aktivierter Neuronen innerhalb einer Population zu einem bestimmten Zeitpunkt der Erregung. Damit gibt diese Methode einen direkten Einblick über die räumlich-zeitliche Erregungsausbreitung innerhalb der Nervenzellpopulation. Wie bereits erwähnt, bezieht sich die Beurteilung der auf diese Weise registrierten neuronalen Aktivität auf einen strikt begrenzten Bereich, nämlich auf den des positionierten Diodenarrays.

Anhand der Registrierung der Fluoreszenzsignale konnte in den vorliegenden Untersuchungen die Beobachtungen aus weiteren Studien bestätigt werden, dass bei epileptischen Entladungen keineswegs alle Nervenzellen gleichzeitig aktiv sein müssen (Speckmann, 2008). Demnach ist die gleichzeitige Aktivität mehrerer Nervenzellgruppen ausreichend, um im lokalen EEG epilepsietypische Potentiale auszulösen.

Weiterhin geht aus den durchgeführten Versuchen hervor, dass die räumlich-zeitliche Ausbreitung der reizausgelösten Nervenzellaktivität sich vielfältig präsentieren kann. Die elektrische Reizung kann in einer kurz anhaltenden Depolarisation vieler oder aller Nervenzellen eines bestimmten Bereiches resultieren. Gleichmaßen kann es aber auch zu einer Depolarisation einer weniger großen Anzahl von Nervenzellen kommen, die sich über einen längeren Zeitraum erstreckt. Beide räumlich-zeitlichen Erscheinungsbilder können mit sehr ähnlich aussehenden Feldpotentialen einhergehen. Insofern bietet das optische Registrierverfahren die Möglichkeit, eine exaktere Aussage über die neuronalen Polarisationszustände in definierten Bereichen zu treffen als es mit der konventionellen Ableitung von Feldpotentialen möglich ist. Nichtsdestotrotz ist die Registrierung von Feldpotentialen für einen weiträumigen Überblick über die Aktivität vieler Nervenzellen nötig, so dass beide Methoden idealerweise in Kombination angewendet werden sollten.

3. Schlussfolgerung

Die durchgeführte Studie stellt eine der wenigen Studien dar, in denen die lokal begrenzte Applikation von Wirkstoffen in den hippocampalen Subregionen CA1 und CA3 untersucht wurde. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass die entwickelte Anwendungsmethode eine räumlich begrenzte Applikation von Wirkstoffen zulässt.

Die experimentell ermittelten Daten deuten darauf hin, dass eine lokale Hemmung der GABA_A-vermittelten Inhibition in der CA1- und CA3-Subregion mit einer unterschiedlichen Wirkung auf die regionale Neuronenaktivität einhergeht. Die Untersuchungen zeigten, dass eine Penicillin-Anwendung in der CA3-Region sowohl im Hinblick auf die Spontanaktivität als auch auf die reizausgelöste Aktivität überwiegend mit einer lokalen Erregungssteigerung verbunden ist. Die CA3-Neurone fungieren über die Schaffer-Kollateralen zwar als Schrittmacher für die Aktivität der CA1-Zellen, dennoch können epileptiforme Entladungen räumlich begrenzt in der CA3-Subregion auftreten. Im Gegenzug wirkt sich eine lokale Penicillin-Anwendung in der CA1-Region indirekt meist auch auf die CA3-Zellen aus, was für die überregionale Interaktion der neuronalen Netzwerke spricht. Neben der unidirektionalen Erregungsleitung von CA3 nach CA1 existieren rückläufige Mechanismen zur Regulation der Neuronenaktivität. Grundsätzlich besteht auch die Möglichkeit, dass durch die Penicillin-Applikation in der CA1-Region antidrome Erregungen in den Schaffer'schen Kollateralen ausgelöst werden und so die CA3-Region mit einbezogen wird (Speckmann und Prince, persönliche Mitteilung). Da die Aktivität einer definierten Neuronenpopulation nicht nur durch lokale Regulationsmechanismen, sondern ebenfalls durch das Zusammenspiel überregionaler Verbindungen bestimmt wird, ist es demzufolge essenziell, miteinander agierende Neuronennetzwerke als Ganzes zu betrachten.

Die Kombination der hier angewandten Methoden zur Registrierung der neuronalen Aktivität erlaubt es, eine verlässliche Aussage über den Erregungszustand vieler Neurone in einem Bereich, aber auch einzelner Neuronengruppen innerhalb einer Population zu treffen. Für eine genaue

Aussage über die räumlich-zeitliche Synchronisierung im Neuronenverband ist der Einsatz spannungssensitiver Farbstoffe erforderlich. Diese Methode ist für die Neurophysiologie deswegen so wertvoll, weil die Entschlüsselung der Rolle einzelner Neurone für das Verständnis der funktionellen Organisation neuronaler Netzwerke notwendig ist (Zochowski et al., 2000).

Die große Herausforderung, in den vielfältigen Synchronisierungsmustern bestimmte Abläufe wiederzuerkennen, ist zumindest in dieser Arbeit mit bloßem Auge nicht möglich. Die Entwicklung mathematischer Modelle, die in der Lage sind wiederkehrende Aktivitätsmuster zu charakterisieren, würde eine tiefergehende Analyse der neuronalen Synchronisierung ermöglichen.

Da es sich bei der Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität um einen multifaktoriellen Prozess handelt, werden viele weitere Studien nötig sein, um die Informationsverarbeitung im Gehirn eingehender zu verstehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Epilepsie stellt in Anbetracht der hohen Anzahl betroffener Patienten eine sowohl humanmedizinisch, aber nicht zuletzt auch veterinärmedizinisch relevante neurologische Erkrankung dar. Betroffene Tiere und Menschen leiden an einer dauerhaften Prädisposition zur Entwicklung epileptischer Anfälle. Abhängig von der anatomischen Lokalisation und der räumlichen Ausdehnung des epileptischen Fokus kann das Anfallsgeschehen mit einem vielfältigen klinischen Erscheinungsbild korrelieren. Ein besonders häufiger Entstehungsort epileptischer Aktivität befindet sich im Hippocampus. Aufgrund seiner niedrigen Reizschwelle und seiner intensiv untersuchten funktionellen Organisation wird dem Hippocampus eine besondere Rolle bei der experimentellen Epilepsieforschung zugewiesen. Bisher ist es allerdings noch nicht abschließend gelungen, alle Prozesse zu entschlüsseln, die an der Entstehung, Ausbreitung und Beendigung epileptischer Aktivität beteiligt sind. Diese Studie diente der Erweiterung des Verständnisses bezüglich der Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität in den Subregionen CA1 und CA3 des Hippocampus. Mittels einer fokal applizierten Penicillin-Lösung wurde in diesen definierten Regionen eine lokale Hemmung der GABA_A-vermittelten Inhibition zur Erzeugung begrenzter epileptischer Herde vorgenommen. In beiden Subregionen wurde die Aktivität der Nervenzellen registriert, um eine mögliche Interaktion neuronaler Netzwerke zu beurteilen. Die konventionelle Ableitung von Feldpotentialen erlaubte einen groben Überblick über den aktuellen Aktivitätszustand einer großen Anzahl von Nervenzellen in diesen Bereichen. Das Färben der Hirnschnitte mit dem spannungssensitiven Farbstoff RH 795 und das optische Registrierverfahren ermöglichten zudem einen direkten Einblick in den Polarisationszustand kleiner Nervenzellpopulationen in diesen Subregionen sowie die Beurteilung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung innerhalb des Nervenzellverbandes.

Die experimentell gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die Aktivität der Nervenzellen in diesen definierten Subregionen nicht nur durch lokale Regulationsmechanismen kontrolliert wird. Die Analyse des Verhaltens kleiner

Nervenzellgruppen innerhalb einer Neuronenpopulation verdeutlichte, dass das Synchronisierungsverhalten der Neurone bei epileptischen Entladungen vielfältigen Aktivitätsmustern unterliegt. Außerdem ist das Vorliegen epileptischer Aktivität nicht notgedrungen mit der zeitgleichen Depolarisation aller Neurone innerhalb einer Population verbunden. Weiterhin können ähnlich aussehende Feldpotentiale mit einem unterschiedlichen Ausmaß der Depolarisation verbunden sein.

Somit ist es durch das Untersuchungsvorhaben gelungen, ein Modell zur fokalen Anwendung von Wirkstoffen an vitalen Hirnschnitten zu entwickeln. Weiterhin ermöglichte die Erfassung der Erregungszustände genau definierter Neuronengruppen die Darstellung der Bedeutsamkeit einer überregionalen Interaktion neuronaler Netzwerke bei der Regulierung der lokalen Populationsaktivität.

VII. SUMMARY

Epilepsy is considered to be one of the most relevant chronic neurological diseases with a high number of affected patients in veterinary and human medicine. The brain dysfunction is associated with a permanent predisposition to generate epileptic seizures. Depending on the anatomic localisation and the spatial propagation of the epileptic focus, the clinical manifestations of epileptic seizures can occur in various ways. The hippocampus appears to be one particularly important structure for the generation of epileptiform activity. Due to the well investigated structural and functional organization and to the remarkable neuronal excitability in this part of the brain, the hippocampus plays an essential role in experimental models of epilepsy. However, not all processes concerning the generation, propagation and termination of epileptiform activity are yet completely understood.

These investigations were performed with the aim to extend the knowledge about the generation and spreading of epileptiform activity in the hippocampal sub-regions CA1 and CA3. A reproducible model for the focal application of proconvulsant agents in ex-vivo brain slices was established with this intention. A penicillin-sodium-solution was used to induce a localized reduction of GABA_A-receptor mediated inhibition leading to epileptic discharges in the hippocampal regions CA1 and CA3. The neuronal activity was recorded in these specific sub-regions to evaluate a possible functional connectivity between local neuronal networks. During the experiments, the extracellular recording of field potentials provided an insight into the general bioelectrical activity of a large number of neurons in these particular hippocampal sub-regions. Simultaneously, the staining of the brain slices with a voltage sensitive dye (RH 795) allowed membrane potential imaging and in this way a detailed examination of the activity of small neuronal sub-populations as well as the visualization of the spatiotemporal propagation of neuronal excitation within specific neuron assemblies.

The collected data suggest that neuronal activity in the hippocampal sub-regions CA1 and CA3 is not only controlled by local mechanisms. By analysing

the level of excitation in well defined neuronal populations, the significance of transregional functional network connectivity was demonstrated. In addition to that, the evaluation of small population activity in a large number of neurons indicates that neuronal activity may appear in various patterns during epileptiform discharges in field potential recordings. Furthermore, epileptic field activity is not necessarily related to a synchronous depolarization of all neurons within a population. Finally it was shown that similar field potentials do not always correlate with the extent of neuronal depolarization.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aiken, SP and Brown, WM. 2000. Treatment of epilepsy: existing therapies and future developments. *Front. Biosci.* 2000, 5, pp. E124-E152.

Akdogan, I and Yonguc, NG. 2011. Experimental epilepsy models and morphologic alterations of experimental epilepsy models in brain and hippocampus. [book auth.] Kaneez FS. Underlying mechanisms of epilepsy. InTech, 2011, pp. 269-282.

Behr, J, Lyson, KJ and Mody, I. 1998. Enhanced propagation of epileptiform activity through the kindled dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 1998, 79, pp. 1726-1732.

Berg, AT et al. 2010. Revidierte Terminologie und Konzepte zur Einteilung von epileptischen Anfällen und Epilepsien: Bericht der Klassifikations- und Terminologiekommision der Internationalen Liga gegen Epilepsie, 2005-2009. *Epilepsia.* 2010, 51(4), S. 676-685.

Bernardo, LS and Pedley, TA. 1984. Basic mechanisms of epileptic seizures. *Cleve. Clin. Q.* 1984, 51, pp. 195-203.

Bielfelt, SW, Redman, HC and McClellan, RO. 1971. Sire- and sex-related differences in rates of epileptiform seizures in a purebred Beagle dog colony. *Am. J. Vet. Res.* 1971, 32, pp. 2039-2048.

Bizière, K and Chambon, J. 1987. Animal models of epilepsy and experimental seizures. *Rev. Neurol.* 1987, 143 (5), pp. 329-340.

Blümcke, I et al. 2013. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A task force report from the ILAE Commission on diagnostic methods. *Epilepsia.* 2013, 54 (7), pp. 1315-1329.

Braunschweig, T. 2008. Histopathologie der Hippocampusklerose bei Epilepsiepatienten. [Dissertationsschrift]. 2008.

Broicher, T and Speckmann, EJ. 2012. Living human brain slices: network analysis using voltage-sensitive dyes. [book auth.] K Ballanyi. Isolated central nervous system circuits. Heidelberg NY: Humana Press (Springer), 2012.

Buckmaster, PS. 2004. Laboratory Animal Models of Temporal Lobe Epilepsy. *Comparative Medicine.* 2004, 54 (5), pp. 473-485.

Cajal, SRy. 1911. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres. Paris: Maloine, 1911. Vol. II.

Chamberland, S and Topolnik, L. 2012. Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Frontiers in Neuroscience.* [Online] 2012.
<http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2012.00165>.

- Cohen, LB, Keynes, RD and Hille, B. 1968.** Light scattering and birefringence changes during nerve activity. *Nature*. 1968, 218, pp. 438-441.
- Collins, RC. 1978.** Kindling of neuroanatomic pathways during recurrent focal penicillin seizures. *Brain research*. 1978, 150, pp. 503-517.
- Curtis, DR et al. 1972.** Convulsive action of penicillin. *Brain research*. 1972, 43, pp. 242-245.
- Davidoff, RA. 1972.** Penicillin and presynaptic inhibition in the amphibian spinal cord. *Brain research*. 1972, 36, pp. 331-333.
- de Lahunta, A and Glass, E. 2009.** *Veterinary Neuroanatomy And Clinical Neurology (3rd Edition)*. St. Louis, MO: Saunders Elsevier, 2009.
- Demarle-Meusel, HS. 2008.** Angststörungen bei Epilepsie-Patienten unter besonderer Berücksichtigung von Kontrollüberzeugungen. [Dissertationsschrift]. 2008.
- Dichter, M, Herman, C and Selzer, M. 1973.** Penicillin epilepsy in isolated islands of hippocampus. *Electroenc. Clin. Neurophysiol.* 1973, 34, pp. 631-638.
- Dingledine, R and Gjerstad, L. 1979.** Penicillin blocks hippocampal IPSPs, unmasking prolonged EPSPs. *Brain research*. 1979, 168, pp. 205-209.
- Kwan, P and Brodie, MJ. 2000.** Early identification of refractory epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342, pp. 314-319.
- Elger, CE and Speckmann, EJ. 1980.** Focal interictal epileptiform discharges (FIED) in the epicortical EEG and their relations to spinal field potentials in the rat. *Electroenc. Clin. Neurophys.* 1980, 48, pp. 447-460.
- El-Hassar, L et al. 2007.** Cell domain-dependent changes in the glutamatergic and GABAergic drives during epileptogenesis in the rat CA1 region. *J. Physiol.* 2007, 578.1, pp. 193-211.
- Fatzer, R et al. 2000.** Necrosis of hippocampus and piriform lobe in 38 domestic cats with seizures: A retrospective study on clinical and pathological findings. *J. Vet. Intern. Med.* 2000, 14, pp. 100-104.
- Fischer, A et al. 2013.** *Die idiopathische Epilepsie des Hundes*. Stuttgart: Enke, 2013.
- Fisher, RS et al. 2014.** A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014, 55 (4), pp. 475-482.
- Fisher, RS et al. 2005.** Epileptische Anfälle und Epilepsie: von der Internationalen Liga gegen Epilepsie (International League Against Epilepsy; ILAE) und dem internationalen Büro für Epilepsie (International Bureau for Epilepsy; IBE) vorgeschlagene Definitionen. *Epileptologie*. 2005, 22, pp. 84-87.
- Frank, I. 2005.** Synthese von dualen NMDA-Rezeptor-/Dopamin-Rezeptor-Liganden. [Dissertationsschrift]. 2005.

Frey, HH und Löscher, W. 2010. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Stuttgart: Enke, 2010.

Fritschy, JM. 2004. A new animal model of temporal lobe epilepsy. *Epileptologie*. 2004.

ILAE, Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. 1989. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*. 1989, 30, pp. 389-399.

Jefferys, JG. 1995. Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiol. Rev.* 1995, 75 (4), pp. 689-723.

Johnston, GAR. 2005. GABAA Receptor Channel Pharmacology. *Current Pharmacological Design*. 2005, 11, pp. 1867-1885.

Jokeit, H. 2010. Neuropsychologie in der Diagnostik und Therapie der mesialen Temporallappenepilepsie. *Epileptologie*. 2010, 27, pp. 72-78.

Kandratavicius, L et al. 2014. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2014, 10, pp. 1693-1705.

Klausberger, T. 2009. GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 2009, 30, pp. 947-957.

Kuriyama, K, Hirouchi, M and Kimura, H. 2000. Neurochemical and molecular pharmacological aspects of the GABA(B) receptor. *Neurochem. Res.* 2000, 25 (9-10), pp. 1233-1239.

Kwan, P and Brodie, MJ. 2000. Early identification of refractory epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342, pp. 314-319.

Lang, M et al. 2014. Regulating hippocampal hyperexcitability through GABAB Receptors. *Physiol. Rep.* 2014, 2 (4), e00278.
<http://physreports.physiology.org/content/physreports/2/4/e00278.full.pdf>.

Langer, M. 2011. Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von Valproat und des Einflusses vom Rattensubstämmen auf die Konsequenzen eines elektrisch induzierten Status epilepticus. [Dissertationsschrift]. 2011.

Le Duigou, C et al. 2013. Recurrent synapses and circuits in the CA3 region of the hippocampus: an associative network. *Front. Cell. Neurosci.* 2013, 7, p. 262.

Lerche, H et al. 2011. Neue Entwicklungen der Epileptogenese und therapeutische Perspektiven. *Der Nervenarzt*. 2011, 8, S. 978-985.

Löscher, W and Potschka, H. 2002. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002, 301, pp. 7-14.

Löscher, W. 2002. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2002, 50 (1-2), pp. 105-123.

Losi, G et al. 2015. A brain slice experimental model to study the generation and the propagation of focally-induced epileptiform activity. *J. Neurosc. Meth.* 2015, 260, pp. 125-131.

Maccaferri, G and Lacaille, JC. 2003. Interneuron diversity series: Hippocampal interneuron classifications - making things as simple as possible, not simpler. *Trends in Neurosciences.* 2003, 26 (10), pp. 564-571.

Matzen, J. 2004. Untersuchungen zur Epileptogenese nach experimentellem Status Epilepticus in vivo. [Dissertationsschrift]. 2004.

Menendez de la Prida, L and Pozo, MA. 2002. Excitatory and inhibitory control of epileptiform discharges in combined hippocampal/enthorinal cortical slices. *Brain Research.* 2002, 940, pp. 27-35.

Miles, R and Wong, RKS. 1983. Single neurons can initiate synchronised population discharge in the hippocampus. *Nature.* 1983, 306, pp. 371-373.

Mulisch, M und Velsch, U. 2010. Romeis - Mikroskopische Technik (18. Auflage). Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2010.

Nolte, MW. 2005. Funktionelle Untersuchungen an einem Tiermodell für Temporallappenepilepsie: Elektrophysiologische und neue therapeutische Strategien. [Dissertationsschrift]. 2005.

WHO (World Health Organization). 2012. Epilepsy. Fact sheet Nr°999. 2012.

Pakozdy, A et al. 2011. Complex partial cluster seizures in cats with orofacial involvement. *J. Feline Med. Surg.* 2011, 13 (10), pp. 687-693.

Pasler, R. 2008. Wirkung des Glutamat-Antagonisten CNQX auf die räumlich-zeitliche Verteilung der synaptischen Aktivierung in der CA1-Region des Hippocampus (Ratte). [Dissertationsschrift]. 2008.

Pellegrini, A, Musgrave, J and Gloor, P. 1979. Role of afferent input of subcortical origin in the genesis of bilaterally synchronous epileptic discharges of feline generalized penicillin epilepsy. *Exp. Neurol.* 1979, 64 (1), pp. 155-173.

Pitkänen, A, Schwartzkroin, PA and Moshé, SL. 2005. Models of seizure and epilepsy. Elsevier Academic Press, 2005.

Pitsch, J. 2008. Untersuchungen zur funktionellen Rolle veränderter Expression und Verteilung von Ionenkanälen und Neurotransmitterrezeptoren bei fokaler Epilepsie unter Verwendung transgener Tiermodelle. [Dissertationsschrift]. 2008.

- Purves, D et al. 2001.** Neuroscience (2nd edition). MA: Sunderland, 2001.
- Rentmeister, K. 2003.** Krampfanfälle bei Hund und Katze, Teil II: Therapie. Tierärztl. Prax. 2003, 31 (K), S. 390-393.
- Scharfman, HE. 2007.** The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. Prog. Brain Res. 2007, 163, pp. 627-637.
- Scheiderman, JH, Sterling, CA and Luo, R. 1994.** Hippocampal plasticity following epileptiform bursting produced by GABAA antagonists. Neuroscience. 1994, 59 (2), pp. 259-273.
- Schindler, K. 2012.** Als Teil des Ganzen oder gegen das Ganze? Schweizer Med. Forum. 2012, 12 (51-52), S. 1008-1009.
- Schmidt, D und Elger, CE. 2002.** Praktische Epilepsiebehandlung (3. Auflage) . Stuttgart : Thieme, 2002.
- Schriefl, S et al. 2008.** Etiologic classification of seizures, signalment, clinical signs and outcome in cats with seizure disorders: 91 cases (200-2004). J. Am. Vet. Med. Assoc. 2008, 233, pp. 1591-1597.
- Schultz, SR and Rolls, ET. 1999.** Analysis of information transmission in the Schaffer collaterals. Hippocampus. 1999, 9, pp. 582-598.
- Schünke, M et al. 2006.** Prometheus Lernatlas der Anatomie, Kopf-, Hals-, und Neuroanatomie. Stuttgart : Thieme, 2006.
- Schwartzkroin, PA and Prince, DA. 1978.** Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices. Brain research. 1978, 147, pp. 117-130.
- Schwartzkroin, PA and Prince, DA. 1980.** Changes in excitatory and inhibitory synaptic potentials leading to epileptogenic activity. Brain research. 1980, 183, pp. 61-76.
- Sik, A et al. 1994.** Inhibitory CA1-CA3-Hilar region feedback in the hippocampus. Science. 1994, 265, pp. 1722-1724.
- Speckmann, EJ and Walden, J. 1991.** Mechanisms underlying the generation of cortical field potentials. Acta Otolaryngol. Suppl. 1991, 491, pp. 17-23.
- Speckmann, EJ. 2008.** Das Gehirn meiner Kunst (2. Auflage). Münster: Daedalus, 2008.
- Speckmann, EJ. 1986.** Experimentelle Epilepsieforschung. Darmstadt: Wissenschaftliche Buchgesellschaft , 1986.
- Sugimoto, M et al. 2002.** The b-lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of action at GABAA receptors. British Journal of Pharmacology. 2002, 135, pp. 427-432.

Tosaki, F, Yuasa, H and Kageyama, N. 1982. Threshold for penicillin induced seizure in hippocampal slice. Nagoya J. Med. Sci. 1982, 45, pp. 37-42.

Trinka, E. 2006. Epilepsie: Mortalität, Todesursachen und Lebenserwartung. [Online] 2006. <http://neurologie-psychiatrie.universimed.com/artikel/epilepsie-mortalit%C3%A4t-todesursachen-und-lebenserwartung>.

Tsuda, A et al. 1994. Effect of penicillin on GABA-gated chloride ion influx. Neurochemical Research. 1994, 19 (1), pp. 1-4.

von Engelhardt, W und Breves, G. 2000. Physiologie der Haustiere. Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag, 2000.

Wagner, E et al. 2014. Hippocampal sclerosis in feline epilepsy. Brain pathol. 2014, 24 (6), pp. 607-619.

Wong, RKS and Prince, DA. 1979. Dendritic mechanisms underlying penicillin-induced epileptiform activity. Science. 1979, 204, pp. 228-231.

Yamamoto, C. 1972. Intracellular study of seizure-like afterdischarges elicited in thin hippocampal sections in vitro. Exp. Neurol. 1972, 35, pp. 154-64.

Zochowski, M et al. 2000. Concepts in Imaging and Microscopy: Imaging membrane potential with voltage-sensitive dyes. Biol. Bull. 2000, 198, pp. 1-21.

IX. ANHANG

1. Geräte

GERÄT	TYP	HERSTELLER
Digitalkamera	EOS D30	Canon, Krefeld
Direktschreiber	Rikadenki	Rikadenki Electronics GmbH, Freiburg im Breisgau
Elektrodenziehgerät	DMZ Universal Puller	Zeitz-Instrumente, München
Endoskopkamera	Findoo Microcam	DNT, Dietzenbach
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135	Carl Zeiss, Oberkochen
Gewebeschneider	Mcllwain Tissue Chopper, Model TC752	Campden Instruments, Leicestershire, UK
Glaskapillaren	Typ GC150TF-10 Innendurchmesser von 0,87 mm	Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Hämatokrit-Kit		Vitrex, Dänemark
Operationsmikroskop		Carl Zeiss, Oberkochen
Software zur Speicherung und Darstellung der Feldpotentiale	AxoScope 10	Axon Instruments, Inverurie, Schottland
Software zur Speicherung und Darstellung der Membranpotentialänderungen	Neuroplex 9.0	Red Shirt Imaging LLC, Decatur, USA
Xenon-Kurzbogenlampe	XBO 75W Osram	Carl Zeiss, Oberkochen

2. Lösungen und Substanzen

Inkubationslösung

NaCl	7,25 g
KCl	0,30 g
NaH ₂ PO ₄	0,17 g
MgSO ₄	0,32 g
NaHCO ₃	2,18 g
C ₆ H ₁₂ O ₆	1,98 g
CaCl ₂	2 ml

Mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen

Mit Carbogenbegasung auf pH 7,35 einstellen

Magnesiumfreie Badlösung

NaCl	7,25 g
KCl	0,30 g
NaH ₂ PO ₄	0,17 g
NaHCO ₃	2,18 g
C ₆ H ₁₂ O ₆	1,98 g
CaCl ₂	2 ml

Mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen


Mit Carbogenbegasung auf pH 7,35 einstellen

Penicillin-Natrium-Lösung

25.000 U Penicillin-G-Natriumsalz in 1 ml Inkubationslösung lösen

SUBSTANZ	BEZUGSQUELLE
CaCl ₂ (1 mol/l)	Eigenherstellung Apotheke des Uniklinikums Münster
C ₆ H ₁₂ O ₆	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isofluran (Forene®)	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen
KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MgSO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaHCO ₃	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin-G-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RH 795	Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA

3. Tierversuchsgenehmigung

Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen		
LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen		Auskunft erteilt: Herr Salert Direktwahl 02361/305-3709 Fax 02361/305-3439 Fachbereich84@lanuv.nrw.de
Herrn Univ.-Prof. Dr. Erwin-Josef Speckmann Institut für Physiologie I - Neurophysiologie Universitätsklinikum Münster Robert-Koch-Straße 27a 48149 Münster		Aktenzeichen 84-02.05.20.13.027 bei Antwort bitte angeben Ihre Nachricht vom: Ihr Aktenzeichen:
Tierschutz; Anzeige nach § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz (TSchG) a) Zuständigkeitsverordnung vom 26. September 1989 (GV NW 1989 S. 508) b) Ihre Anzeige vom 18.02.2013; eingegangen am 19.02.2013		Datum: 25.02.2013 Hauptsitz: Leibnizstraße 10 45659 Recklinghausen Telefon 02361 305-0 Fax 02361 305-3215 poststelle@lanuv.nrw.de www.lanuv.nrw.de
Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Speckmann, Ihre o. g. Anzeige zu dem Versuchsvorhaben „Experimentelle Epilepsieforschung an Hirngewebsschnitten von Ratten und Mäusen“ wird hiermit bestätigt.		Dienstgebäude: Hauptsitz Recklinghausen Öffentliche Verkehrsmittel: Ab Recklinghausen Hbf mit Buslinie 236 oder 237 bis Haltestelle "LANUV" und 5 Min. Fußweg oder mit Buslinie SB 20 bis Haltestelle "Hohenhorster Weg" und 15 Min. Fußweg in Richtung Trabrennbahn bis Leibnizstraße
Verantwortlicher Versuchsleiter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann		
Stellvertretender Versuchsleiter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Thomas Budde		
Weitere beteiligte Personen: Frau Birgit Herrenpoth und Frau Manuela Cerina		
Personen, die Eingriffe und Behandlungen innerhalb des Versuchsvorhabens durchführen sollen und die Voraussetzungen nach § 9 Abs. 1 Satz 3 des TierSchG nicht erfüllen, dürfen erst nach Erteilung einer Ausnahmegenehmigung gem. § 9 Abs. 1 Satz 4 des TierSchG eingesetzt werden.		Bankverbindung: Landeskasse Düsseldorf Konto-Nr.: 41 000 12 West LB AG (BLZ 300 500 00) BIC-Code: WELADED3 IBAN-Code: DE 41 3005 0000 0004 1000 12

Seite 2 / 25.02.2013

Art und Zahl der Tiere: 300 Ratten und 300 Mäuse

Dauer des Versuchsvorhabens: Bis zum 29.02.2016

Ort: Institut für Physiologie I des Universitätsklinikums Münster

Ändern sich während des Versuchsvorhabens die von Ihnen in Ihrer Anzeige angegebenen Sachverhalte, so sind mir diese unverzüglich anzuzeigen.

Nach § 8 a Abs. 3 Tierschutzgesetz ist mir am Ende eines jeden Jahres die Zahl der durchgeführten Versuchsvorhaben sowie bei Wirbeltieren Art und Zahl der insgesamt verwendeten Wirbeltiere anzugeben.

Von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr wird abgesehen, da die Tierversuche überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgen.

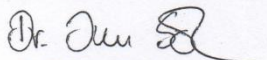
Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage erhoben werden. Die Klage ist schriftlich vor dem Verwaltungsgericht Münster (Piusallee 38, 48147 Münster) oder zur Niederschrift beim Urkundsbeamten der Geschäftsstelle zu erklären.

Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag


(Dr. Salaschek)

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für die ausgezeichnete Betreuung dieses spannenden Themas. Ihre stetige konstruktive und anregende fachliche Unterstützung war mir für die Abfassung dieser Dissertation eine große Hilfe.

Bei Herrn Prof. Dr. Erwin-Josef Speckmann möchte ich mich aufrichtig bedanken für die warmherzige Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit. Sein Enthusiasmus war stets ansteckend und die unzähligen fachlichen und persönlichen Diskussionen mit ihm haben mir unglaublich viel Freude bereitet.

Ein großer Dank geht an Birgit Herrenpoth, die mir bei der Planung und Durchführung der Versuche geduldig mit ihren fachlichen Kompetenzen zur Seite stand. Ohne ihr Engagement wäre ein reibungsloser Ablauf im Labor nicht möglich gewesen.

Mein ehrlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere danke ich Manuela Cerina für die Einarbeitung in die komplexe Versuchsthematik sowie Ingrid Winkelhues und den Mitarbeitern der E-Werkstatt für die Beseitigung aller technischen Konflikte. Vielen Dank an die Feinmechaniker für die Kreativität und die schnelle Umsetzung der Ideen. Herrn Dr. Bidmon möchte ich danken für die hilfreiche Einbringung seiner fachlichen Kenntnisse.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meiner Familie für jegliche Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung dieser Dissertation.